DAS MUREIN-LIPOPROTEIN VON ESCHERICHIA COLI-UNTERSUCHUNGEN ÜBER SEINE STRUKTUR, BIOSYNTHESE UND ANTIGEN – EIGENSCHAFTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
J. Valerie Bosch
aus Glasgow

1974

DAS MUREIN-LIPOPROTEIN VON ESCHERICHIA COLI-UNTERSUCHUNGEN ÜBER SEINE STRUKTUR, BIOSYNTHESE UND ANTIGEN – EIGENSCHAFTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
J. Valerie Bosch
aus Glasgow

1974

1. Referent: Herr Prof. Dr. V. Braun

2. Referent: Herr Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Herrn Prof. Dr. V. Braun möchte ich sehr herzlich danken für die Überlassung des Themas sowie für zahlreiche Anregungen und Diskussionen und seine stetige Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Tier-Hauses und der Gruppe Stöffler danke ich für die Hilfe bei der Immunisierung, Herrn Dr. P. Herrlich für die Abnahme von menschlichem Blut.

Ulla Günthert, Herbert Stadler und besonders meinem Mann Franz danke ich für die Hilfe bei der Übersetzung.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für das Stipendium.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	1
1. Einleitung	2
1.1. Fragestellung	6
2. Material und Methoden	9
2.1. Analytische Methoden: Radioaktivitätsmessungen, Aminosäureanalysen, Proteinbestimmung, Trennung von Diaminopimelinsäure und Lysin	9
2.2. Bakterienstämme und Medien	11
2.3. Präparation von Murein-Lipoprotein-Komplex (M-MLP)	12
2.3.1 Isolierung von Lipoprotein und Muropeptiden	13
2.3.2 Präparation von zuckerfreiem Lipoprotein	14
2.4. Radioaktive Markierung mit ^{3}H-Diaminopimelinsäure	15
2.4.1 Durchmarkierung	15
2.4.2 Pulsversuche	15
2.4.3 Puls-Chase Versuche	15
2.5. Trennung der Membrane	16
2.5.1 Osborn Methode	16
2.5.2 Trypsinmethode	18
2.6. Charakterisierung von radioaktiven Produkten	19
2.6.1 Extraktion	19
2.6.2 Lysozym- und Pronase-Spaltung	20
2.6.3 Schwache Säurehydrolyse	20
2.6.4 Freisetzung des Lactylpentapeptids	20
2.6.5 Papierchromatographie	21
2.7. Immunologische Methoden	21
2.7.1 Präparation von Antiseren	21
2.7.2 Solubilisierung von Lipoprotein	23

2.7.3 Beschichten von Erythrozyten mit Lipoprotein 23

2.7.4 Passive Hämagglutination 23

2.7.5 Immunhämolyse-Inhibierung 24

3. Ergebnisse und Diskussion 27

3.1. Sequenzanalyse des Lipoproteins 27

3.2. Struktur der Bindung des Lipoproteins an das Murein 32

3.3. Diskussion der vollständigen Struktur des Lipoproteins 38

3.4. In vivo - Untersuchungen zur Biosynthese von Murein und Murein-Lipoprotein 41

3.4.1 Räumliche Lage des Lipoproteins ausgehend vom Murein 41

3.4.2 Kinetik des Transfer der Murein-Vorstufen durch die Cytoplasmamembran 44

3.4.3 Membran-gebundene Vorstufen des Murein-Lipoprotein-Komplexes. Osborn-Methode 47

3.4.4 Membran-gebundene Vorstufen des Murein-Lipoprotein-Komplexes. Trypsin-Methode 57

3.5. Lipoprotein, an neusynthetisiertes Murein gebunden. Die Existenz einer SDS-löslichen, polymerisierten Murein-Vorstufe 63

3.6. Diskussion der in vivo Untersuchungen über die Biosynthese des Murein-Lipoprotein-Komplexes 67

3.7. Immunologische Experimente 70

3.8. Antiserum gegen "Lysozym-Lipoprotein" 73

3.8.1 Erste Kontrollen-Muropeptide, Lysozym, Phospholipide, Lipopolysaccharide 74

3.8.2 Der Effekt von Lysozym 77

3.8.3 Verteilung der inhibierenden Aktivität in E.coli 79

3.8.4 Der Effekt von Trypsin (und Thermolysin) 82

3.8.5 Der Effekt von Pronase 84

3.8.6 Chemische Modifizierung des Tyrosins durch Jodierung und Nitrierung 84

3.8.7 Inhibierende Aktivität in Bacillus brevis 85

3.9. Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein 86

3.9.1 Kreuzreaktion zwischen Antiseren gegen zuckerfreies und "Lysozym-Lipoprotein" 87

3.9.2 Der Effekt von Trypsin 87

3.9.3 Der Effekt von Carboxypeptidase b 89

3.9.4 Verteilung der inhibierenden Aktivität in E.coli 90

3.9.5 Inhibierung durch andere Bakterien-Spezies 93

3.10. Antiserum gegen hitze-getötete Bakterien 94

3.11. Diskussion der immunologischen Experimente 97

4. Zusammenfassung 100

5. Literaturverzeichnis 102

Lebenslauf 106

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546512_0003

Abkürzungen

BSA	Rinderserum Albumin
Dap	α,ε, Diaminopimelinsäure
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
GlcNAc	N-acetylglucosamin
LP	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M-MLP	Murein-Lipoprotein-Komplex
MurNAc	N-acetylmuraminsäure
O.D.	Optische Dichte
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan

In der vorliegenden Arbeit wurde die englische Schreibweise für Zahlen verwendet: gebrochene Zahlen (Dezimalzahlen) haben einen Punkt anstelle des Kommas (z.B. 10.3 = zehn Komma drei). Mehr als dreistellige ganze Zahlen sind mit Komma anstatt mit Punkt geschrieben (z.B. 1,003 = tausendunddrei).

I. Einleitung

Man weiß inzwischen,daß biologische Membranen nicht nur als Permeabilitätsbarrieren zwischen verschiedenen Bereichen einer Zelle oder zwischen der Zelle und ihrer Umgebung dienen, sie sind darüber hinaus an fast allen zellulären Phänomenen beteiligt. In Eukaryonten spielen verschiedene Membranen eine Rolle in verschiedenen spezifischen Funktionen (z.B. ist die Kernmembran an der DNA-Replikation beteiligt, die Mitochondrienmembran an der oxydativen Phosphorylierung usw.), in Prokaryonten jedoch werden alle diese Funktionen von der Cytoplasmamembran wahrgenommen. Dennoch, trotz des oft extremen funktionellen Unterschieds zwischen verschiedenen Membranen, scheint ihnen eine generelle, grundlegende Struktur gemeinsam zu sein. Die Wechselwirkung zwischen den Proteinen und den Lipiden der Membran bestimmt diese Struktur und Singer und Nicolson (40) haben ein Modell vorgeschlagen, das auf theoretischen Überlegungen aufgebaut ist und z.B. im Falle der Erythrozytenmembran bestätigt wurde (12). Ihr "Flüssiges Mosaik Modell" basiert darauf, daß die Membranproteine amphipatisch sind, d.h. sowohl polare als auch apolare Bereiche enthalten. Die apolaren Bereiche sind in die Lipid-Doppelschicht eingebettet, während die polaren Gruppen sich in die wässrige Phase erstrecken und auch mit den polaren Gruppen der Phospholipide in Wechselwirkung treten. Daher sind verschiedene Proteine, abhängig von ihren Struktureigenschaften, in größerem oder kleinerem Ausmaß in die Lipid-Doppelschicht eingebettet, wobei ein Protein, das die ganze Membran durchspannt, den extremen Fall darstellt.

Enterobakteriaceen wie Escherichia coli besitzen eine äußere Membran (auch Zellwand genannt), welche die Cytoplasmamembran umgibt. Viele Evidenzen deuten darauf hin, daß diese Zellwand nicht nur eine Schutzfunktion hat. Sie enthält z.B. Bindeproteine, die am aktiven Transport beteiligt sind wie auch die Rezeptoren, welche mit Colecinen und Phagen in Wechselwirkung treten. Die Zellwand von E.coli ist eine der am ausgiebigsten untersuchten biologischen Membranen.

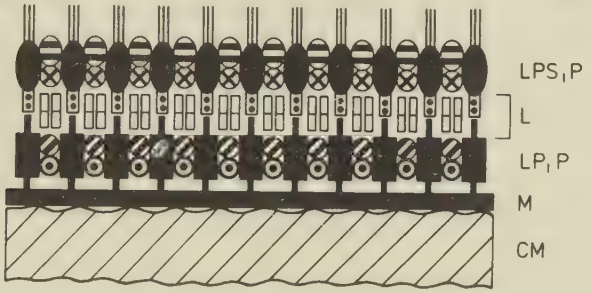


Abb. 1 Schematische Darstellung der Zellwand von E.coli

LPS Lipopolysaccharide, P Protein,
L Lipid-Doppelschicht, LP Lipoprotein,
M Murein, CM Cytoplasmamembran

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Aufbau der Zellwand von E.coli. Die innerste Schicht (der Cytoplasmamembran am nächsten gelegen) ist der Murein-Sacculus (Peptidoglycan, Mukopeptid), welcher für die Festigkeit der Zelle verantwortlich ist. Dieses kovalente Netzwerk wird im Folgenden noch ge-

nauer beschrieben. Der ursprüngliche Hinweis für die Existenz von Murein-Lipoprotein-Molekülen, kovalent an das Netzwerk (des Mureins) gebunden, war das ständige Vorkommen von zusätzlichen Aminosäuren und Lipid im isolierten Murein-Sacculus (7,9,10). Die anderen Komponenten der Zellwand, d.h. Lipide, Proteine und Lipopolysaccharide sind über dem Murein-Sacculus angeordnet. Die Lipopolysaccharide stellen die äußerste Schicht dar; ihre chemische Zusammensetzung und ihre Biosynthese sind weitgehend bekannt, obwohl die meisten Untersuchungen an Salmonella durchgeführt wurden (32). Die Zusammensetzung der Phospholipide ist ebenfalls bekannt. Nur sehr wenige Proteine sind jedoch einer detaillierteren Untersuchung unterzogen worden, darunter befinden sich hauptsächlich Bindeproteine für aktiven Transport, die nach osmotischem Schock freigesetzt werden (35).

Der Murein-Sacculus in E.coli (siehe Abb. 1) ist eine starre Struktur zwischen Cytoplasmamembran und Zellwand. Er besteht aus Polysaccharid-Ketten, zusammengesetzt aus alternierenden Resten von N-acetylglucosamin (GlcNAc) und N-acetylmuraminsäure (MurNAc), in β1-4 Stellung miteinander verknüpft. Die einzelnen Ketten sind durch Peptidbrücken zwischen der Aminogruppe am D-Zentrum von Diaminopimelinsäure (Dap) und der Carboxylgruppe eines gegenüberliegenden D-Alanin quervernetzt (49). Die chemische Struktur einer Murein-Untereinheit ist in Abbildung 2 dargestellt. Gramnegative Bakterien besitzen ein dünnes, wahrscheinlich einschichtiges Murein, das die ganze Zelle umschließt.

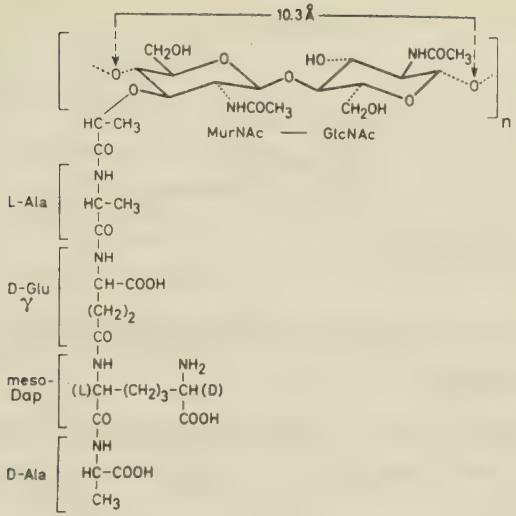


Abb. 2a. Die Struktur einer Murein-Untereinheit

Eine solche Untereinheit entsteht nach Lysozym-Spaltung von Murein. Die Länge der Disaccharid-Einheit N-acetylmuramyl - N - acetylglucosamin (10.3 Å) wurde von Röntgenstruktur-Analysen an Cellulose und Chitin abgeleitet (13). Während der Biosynthese von Murein wird UDP-MurNAc-pentapeptid durch seine 1-Hydroxylgruppe an einen Lipid-Träger gebunden und dann wird GlcNAc von UDP-GlcNAc auf die 4-OH-Gruppe des MurNAc übertragen. Das Lipoprotein wird, wenn anwesend, durch die ε-Aminogruppe seines C-terminalen Lysins mit der L-Carboxylgruppe von Dap verknüpft, d.h. es ersetzt D-Ala in dieser Position. MurNAc = N-acetylmuraminsäure; GlcNAc = N-acetylglucosamin, L-Ala = L-alanin, D-Glu = D-glutaminsäure; Dap = mesodiamino-

pimelinsäure; D-Ala = D-alanin.

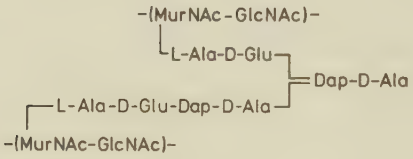


Abb. 2b. Quervernetzung zwischen zwei benachbarten Polysaccharid-Ketten

Diese entsteht zwischen der Aminogruppe am D-Zentrum von Dap und der Carboxylgruppe des gegenüberliegenden D-Ala.

Die frühen Schritte in der Murein-Biosynthese, die zur Bildung von UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptid und UDP-N-acetylglucosamin führen, finden an löslichen Enzymen statt, die wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisiert sind (Zusammenfassung in 19, 41). Die neusynthetisierten Murein-Vorstufen müssen die Cytoplasmamembran passieren, um den wachsenden Sacculus zu erreichen. Strominger et al konnten für E.coli in vitro zeigen, daß die Vorstufen auf einen Lipid-Träger (ein C_{55}-isoprenylphosphat) innerhalb der Zellhülle übertragen werden und daß von diesem Lipid-Zwischenprodukt ein Murein synthetisiert wird, das normale Abbauprodukte nach Lysozym-Spaltung ergibt (27,44).

1.1 Fragestellung

Der ständige Nachweis von Protein und Lipid zusammen mit dem isolierten Murein hatte zum Konzept der Existenz von

Lipoprotein-Molekülen geführt, die, alle von identischer Struktur, auch alle kovalent gebundenes Lipid enthalten und durch eine kovalente Bindung mit dem Murein verknüpft sind. Die Natur einer kovalenten Bindung von Lipid an Protein ist bisher nicht beschrieben worden. In den meisten Lipoproteinen (z.B. im Serum) sind die Lipide nur durch physikalische Wechselwirkungen an Protein gebunden.

Die ursprünglichen Befunde, obwohl überzeugend, schlossen jedoch die Möglichkeit nicht aus, daß das im isolierten Murein verbleibende Protein aus einer Verunreinigung mit irgendwelchen Membranproteinen stammte. Diese Frage konnte zweifelsfrei nur durch Strukturanalyse der Lipid- und Polypeptid-Anteile und Aufklärung der Bindungsarten untereinander geklärt werden. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit ist die Bestimmung der vollständigen Aminosäure-Sequenz des Lipoproteins und die Natur seiner Bindung an das Murein beschrieben. Hantke und Braun (22) haben daran anschließend die Struktur des Lipids und seine Bindungsart zur Polypeptidkette aufgeklärt.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit werden in vivo die terminalen Schritte in der Biosynthese von Murein und Murein-Lipoprotein untersucht. Die generelle Methode ist radioaktive Markierung mit der Murein-spezifischen Komponente Diaminopimelinsäure. Die Frage, die sich zunächst stellt, ist die räumliche Orientierung des Lipoproteins innerhalb der Zellwand. Weitere Fragen betreffend der Murein-Biosynthese sind a) wo innerhalb der Zellhülle werden die UDP-aktivierten Murein-

Untereinheiten auf den Lipid-Träger übertragen und b) welche Schritte nach der Bildung der Lipid-gebundenen Vorstufen führen zur Produktion von fertigem Murein? Letztere Frage kann noch enger definiert werden: wo findet die ursprüngliche Polymerisation und Transpeptidierung statt und was ist der Akzeptor? Darüber hinaus muß die kovalente Anlagerung des Lipoproteins an das Murein eng gekoppelt sein mit der Synthese des Mureins selbst.

Die Nützlichkeit von Markierungs-Experimenten mit ^{3}H-Dap ist jedoch begrenzt. Frühere Schritte in der Biosynthese von Lipoprotein, wenn Diaminopimelinsäure noch nicht gebunden ist, können nicht untersucht werden. Auch die Fragen nach dem Vorkommen des Lipoproteins in mit E.coli verwandten Spezies kann so nicht beantwortet werden. Um diese Probleme anzugehen, empfehlen sich immunologische Methoden. Im dritten Abschnitt der vorliegenden Dissertation werden die Spezifitäten von gegen Lipoprotein produzierten Antiseren untersucht und diese Antiseren dazu benutzt, um einige der oben gestellten Fragen zu beantworten.

2. Material und Methoden

Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien haben analytische Reinheit (p.a.) und sind bezogen von der Firma Merck, Darmstadt, soweit nicht anders vermerkt.

2.1 Analytische Methoden

Radioaktive Messungen

Flüssige Proben (maximales Volumen 1 ml) werden gemessen nach Zugabe von 5 ml Aquasol (Szintillationsflüssigkeit von New England Nuclear, Bosten, Mass.) in einem Isocap 300 Nuclear Chicago Szintillationszähler. Wenn die Proben Sucrose enthalten (von Sucrosedichtegradienten), muß deren Konzentration durch Zugabe von Wasser auf weniger als 24% gesenkt werden. Höhere Sucrosekonzentrationen verursachen einen starken "Quench" der radioaktiven Messung. Im allgemeinen werden 50 ul der einzelnen Fraktionen von Sucrosedichtegradienten vor der Zugabe von Aquasol mit 0.5 ml H_2O verdünnt. Die Radioaktivität der Papierchromatogramme wird bestimmt durch Zerschneiden des Papiers in Stücke von 2 cm^2 und anschließendes Zählen in 5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit (0.28% PPO, 0.09% POPOP).

Aminosäureanalysen

Aminosäureanalysen werden durchgeführt mit einem Unichrom Aminosäureanalysator (Beckman), wie in (7) beschrieben. Peptide werden hydrolysiert in 2 ml destillierter 6 N HCl bei 105°C

für 18 Stunden unter Stickstoff. Da aber Muraminsäure und Glukosamin teilweise zerstört werden bei dieser Behandlung, werden Proben, die diese Zucker enthalten, in 4N HCl bei 105°C für 14 Stunden hydrolysiert.

Proteinbestimmung - Ninhydrinmethode

Zur Anfertigung einer Standardkurve werden 5, 10, 20, 40 und 80 µg Rinderserumalbumin (Lösung 0.2 mg/ml) in einem dickwändigen Teströhrchen für 2.5 Std. in 1 ml 2.5 N NaOH bei 90°C hydrolysiert. Danach wird 1 ml 30%ige Essigsäure zugefügt, um den pH-Wert auf etwa 5.5 einzustellen. Nach Zugabe von 1 ml Ninhydrinlösung werden die Proben kräftig geschüttelt und 15 Minuten in kochendem Wasser inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die optische Dichte der Lösungen bei 578 nm Wellenlänge gemessen und eine Standardkurve gezeichnet. Der Proteingehalt unbekannter Proben kann dann anhand der Kurve bestimmt werden, nachdem sie hydrolysiert und angefärbt sind wie oben beschrieben.

Ninhydrinlösung: 3 g Ninhydrin und 1 g Hydrindantin werden in 375 ml Äthylenglykolmonomethyläther gelöst. Stickstoff wird ständig durch die Lösung geleitet. Nach Zugabe von 125 ml 4 M natriumacetat-Puffer pH 5.5 wird die Lösung unter Stickstoff bei 4°C aufbewahrt.

Trennung von Diaminopimelinsäure und Lysin

Standardmengen geeigneter Proben (in dieser Arbeit Membrane von E.coli W7-2, markiert mit ^{3}H-Dap) werden in 6 N HCl bei 105°C für 21 Std. hydrolysiert, zur Trockene eingeengt und

in 1 ml H_2O aufgenommen. Das Hydrolysat wird dann auf eine Dowex 50X2 Säule (4 x 0.7 cm) aufgetragen, die mit 0.1 M Pyridinformiat pH 3.0 äquilibriert worden ist. Die Elution erfolgt mit 2 ml Äquilibrierpuffer, gefolgt von 5 ml 0.3 M Pyridinformiat pH 3.5 und anschließend 3 ml 2 M Pyridinformiat pH 5.0. Der Säulenausfluß wird in 1 ml Portionen direkt in Szintillationsfläschen gesammelt und die Radioaktivität bestimmt nach Zugabe von 5 ml Aquasol. Dap wird eluiert bei Fraktion 5 und Lysin bei Fraktion 9.

2.2 Bakterienstämme und Medien

Für die Herstellung größerer Mengen von Murein-Lipoproteinkomplex ist E.coli B/r verwendet worden. Die Zellen sind bei E. Merck, Darmstadt, kultiviert worden in einem Glukose-Salzmedium, angereichert mit 1% Hefeextrakt. Sie sind in der späten logarithmischen Phase geerntet und bei -60°C aufbewahrt worden.

Folgende Stämme sind für radioaktive Markierungen benutzt worden:

E.coli W7 (dap^-, lys^-) ist ein Abkömmling von E.coli W 173-25 (dap^-) und stammt von Dr. U. Schwarz, Tübingen (23). Die Zellen werden gezogen in TB-Medium (1% Tryptone Broth (Difco), 0.5% NaCl), dem 3 µg Dap/ml (Serva, Heidelberg) zugesetzt sind. Bevor mit ^{3}H-Dap gepulst werden kann, muß der hohe Gehalt an cytoplasmatischem Dap in E.coli W7(4) aufgebraucht werden. Deswegen werden die Zellen abzentrifugiert, resuspendiert in

Dap-freiem Medium und weiter bis kurz vor der Lyse gezüchtet. Anhand einer Kontrollkultur, die 30 Minuten vorher angesetzt worden ist, kann festgestellt werden, bei welcher optischen Dichte die Zellen lysieren.

E.coli W7-2 ist eine spontane Revertante von W7 mit intakter Dap-Decarboxylase. Die Zellen werden gezüchtet in Minimalcitratmedium (46), versetzt mit 0.1% Casamino acids, 0.5% Glukose und 25 µg/ml Dap. Da E.coli W7-2 keinen Dap-Pool enthält, brauchen die Zellen vor der radioaktiven Markierung nicht ausgehungert zu werden.

Weitere Bakterienstämme, die in den immunologischen Experimenten verwendet werden, sind aufgeführt in der Liste auf Seite 93 . Sie werden alle in TB-Medium bei 37°C gezüchtet.

2.3 Präparation von Murein-Lipoproteinkomplex (M-MLP)

200 g tiefgekühlte E.coli B/r Zellen werden schnell aufgetaut, wobei die Temperatur der Suspension 10°C nicht überschreiten sollte. 80 - 100 ml H_2O und 12 mg Desoxyribonuklease (aus Rinderpankreas, salzfrei, lyophilisiert; Mann Res. Lab., New York) werden zugegeben. In 4 Portionen werden die Zellen mit 240 g Glasperlen, Ø 0.17 - 0.18 mm (Braun, Melsungen) für 7-8 Minuten unter Eiskühlung mit einem Homogenisator (Bühler, Tübingen) geschüttelt, bei einer Geschwindigkeit von 5.000 - 6.000 Schwingungen pro Minute. Der Aufschluß wird unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt, um sicher zu gehen, daß mindestens 90% der Zellen geöffnet sind. Das Homogenisat wird von

den Glasperlen abgetrennt durch Filtration über eine GZ-Glasfritte. Pro 100 ml Suspension werden 11 ml 0.1 M EDTA pH 8.0 zugegeben und die Zellhüllen für 1.5 Stunden bei 10.000 g abzentrifugiert. Das Sediment wird zweimal mit H_2O gewaschen und dann in 150 ml H_2O gut suspendiert. Diese Suspension wird in 1,2 l kochende 4%ige SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat; Serva, Heidelberg) gepumpt. Die abgekühlte Lösung wird für 1 Stunde bei 18.000 g und 20°C abzentrifugiert (SDS fällt bei niedrigen Temperaturen aus). Das aus unlöslichem Murein-Lipoproteinkomplex bestehende Sediment wird zum Entfernen von SDS viermal mit Wasser gewaschen. Es wird dann in einem kleinen Volumen Wasser gut suspendiert und 10 Minuten lang bei 2.000 g abzentrifugiert,um große Teilchen abzutrennen. Die Ausbeute beträgt 750-850 mg Murein-Lipoproteinkomplex. Normalerweise wird dieser sofort weiter bearbeitet, kann aber auch in lyophilisiertem Zustand aufbewahrt werden, was allerdings Schwierigkeiten beim Resuspendieren hervorruft.

2.3.1 Isolierung von Lipoprotein und Muropeptiden

Der Murein-Lipoproteinkomplex aus 200 g E.coli B/r Zellen wird suspendiert in 300 ml H_2O und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Die Suspension wird über Nacht mit 25 mg Hühnereiweisslysozym (Boehringer, Mannheim) bei 37°C inkubiert. Nach Einstellen des pH auf 8.4 wird unverdauter Murein-Lipoproteinkomplex bei 10.000 g für 1.5 Stunden abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 20 ml eingeengt und aufgetragen auf eine 6 x 200 cm Sephadex G75 Säule, die mit 0.01 M $NaHCo_3$ äquilibriert

ist. Die Elution der Säule erfolgt mit dem gleichen Puffer. Wegen seiner Aggregationsneigung tritt das Lipoprotein mit dem Ausschlussvolumen auf, abgetrennt von Lysozym und Muropeptiden. Der Säulenausfluß wird mit Ninhydrin getestet und die Fraktionen des ersten Gipfels, die das Lipoprotein enthalten, werden vereint, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die später auftretenden Gipfel, die die Muropeptide enthalten, werden gemeinsam auf einer Sephadex G10 Säule entsalzt und lyophilisiert.

2.3.2 Präparation von zuckerfreiem Lipoprotein

M-MLP aus 200 g E.coli B/r Zellen wird suspendiert in 90 ml 0.01 M Tris-HCl pH 8.4 und mit 90 mg Trypsin (vom Rind, kristallisiert, Serva, Heidelberg) bei 37°C für 30 Minuten gespalten. Der Inkubationsansatz wird schnell auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit 2.5 M NaOH auf pH 12.0 eingestellt, weiter abgekühlt auf 3°C und 1 Stunde lang bei 30.000 g zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene zuckerfreie Lipoprotein wird mit 450 ml Aceton präzipitiert, abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Ein Teil des zuckerfreien Lipoproteins hat allerdings die Tendenz, an dem Mureinsacculus haften zu bleiben. Um dieses haftengebliebene Lipoprotein zu erhalten, wird das Mureinsediment zunächst dreimal mit Wasser gewaschen, in 60 ml H_2O aufgenommen und dann tropfenweise in 60 ml kochende 10%ige SDS-Lösung eingeleitet. Die Suspension wird bei 30.000 g für 1 Stunde zentrifugiert. Der Überstand enthält zuckerfreies Lipoprotein, das durch Zufügen von 200 ml Aceton

ausgefällt wird. Das Präzipitat wird abzentrifugiert, in 10 ml 10%igem Aceton (in H_2O) aufgenommen und noch einmal gefällt mit 2 ml 10%iger Trichloressigsäure (TCA). Der Niederschlag wird einmal mit Wasser gewaschen und dann lyophilisiert.

2.4 Radioaktive Markierung mit ^{3}H-Diaminopimelinsäure

2.4.1 Durchmarkierung

E.coli W7-Zellen werden für mehrere Generationen in TB-Medium gezüchtet, das mit 0.33 µCi (3 µg) ^{3}H-Dap/ml angereichert ist. Die Präparation von radioaktivem Murein-Lipoprotein-Komplex aus diesen Zellen erfolgt mit der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Methode.

2.4.2 Puls-Versuche

Normalerweise werden E.coli W7-Zellen ausgehungert wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Die logarithmisch wachsenden, ausgehungerten Zellen werden in einer warmen Zentrifuge geerntet und in TB-Medium von ca. 1/15 des Ausgangsvolumens aufgenommen. 5-10 µg ^{3}H-Dap/ml werden zugesetzt. (^{3}H-Dap, spez. Akt-200 mCi/mM, wurde meist von Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen; für spätere Versuche wurde ^{3}H-Dap, spez. Akt-36 Ci/mM, vom Isotopendienst West, 6555 Sprintlingen bezogen.) Die Zellsuspension wird bei 37°C für 45 Sek. schnell geschüttelt und anschließend auf Eis + 0.1 M KCN gegeben.

2.4.3 Puls-Chase-Versuche

E.coli W7-2 Zellen werden in Minimalcitratmedium, ver-

setzt mit 0.1% Casamino-Säuren, 0.5% Glukose und 25 µg/ml Dap gezüchtet. Die Zellen werden in der logarithmischen Phase durch Zentrifugation in einem warmen Rotor geerntet. Danach werden die Zellen aufgenommen in einem Volumen Minimalcitratmedium mit 0.5% Glukose, das ungefähr 1/15 des Ausgangsvolumens entspricht. Die Suspension wird bei 37°C für 5 Min. geschüttelt vor der Zugabe von 5-10 µCi ^{3}H-Dap/ml (spez. Akt. 200 mCi/mM von Radiochemical Centre Amersham, England). Das Schütteln bei 37°C wird fortgesetzt und zu geeigneten Zeiten werden Portionen entnommen und auf Eis + 0.1 M KCN pipettiert (Puls-Proben). Danach wird zu der restlichen Kultur das 10fache Volumen Medium, angereichert mit 125 µg Dap/ml, gegeben. Es wird weiter bei 37°C geschüttelt und zu geeigneten Zeiten werden Portionen entnommen und auf Eis + 0.1 M KCN gegeben (Chase-Proben).

2.5 Trennung der Membrane

2.5.1 Osborn Methode (34)

Zellen werden bei 16,000 g für 10 Min. bei 0°C abzentrifugiert. Nach gründlicher Entfernung des Mediums wird das Zellsediment schnell suspendiert in kalter 0.75 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.8. Das Puffervolumen wird nach der folgenden Formel ausgerechnet:

Puffervolumen = Kulturvolumen x O.D. x 7/100

Lysozym wird bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Das heißt, pro ml Zellsuspension werden 0.05 ml Lysozymlösung (2mg/ml in H_2O) zugesetzt. Die Suspension wird für 2 Min.

bei $0^{o}C$ inkubiert. Dann werden 2 Volumina kaltes 1.5 mM EDTA pH 7.5 langsam (in 8-10 min.) in die Zellsuspension gepumpt.

Sowohl Plasmolyse (nachdem die Zellen in hypertonischer Sucroselösung suspendiert worden sind) als auch Sphaeroplastenbildung (hervorgerufen durch die gemeinsame Wirkung von Lysozym und EDTA) können im Phasenkontrastmikroskop verfolgt werden. Bei der Plasmolyse sind die Zellen zwar noch stäbchenförmig, zeigen aber dunkle Flecken an den Stellen, an denen das Cytoplasma konzentriert ist, weil sich die Cytoplasmamembran von der äußeren Membran gelöst hat. Die Sphaeroplasten dagegen sind rund, weil das Murein-Netzwerk, das die Stäbchenform determiniert oder stabilisiert, durch Lysozym abgebaut worden ist.

Die Sphaeroplasten werden mit Ultraschall aufgebrochen, bis die optische Dichte auf weniger als 10% der Ausgangsdichte zurückgegangen ist. Noch verbliebene ganze Zellen werden durch Abzentrifugieren (20 Min. $0^{o}C$, 1500 g) entfernt. Danach werden die Membrane bei 140.000 g für 2 Std. bei $4^{o}C$ abzentrifugiert; das Membran-Sediment wird einmal in 0.25 M Sucrose, 3.3 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5 gewaschen. Mit Hilfe einer mit einer sehr feinen Nadel ausgerüsteten Spritze werden die Membrane sorgfältig in 25% (Gew.%) Sucrose suspendiert.

Sucrosegradienten werden folgendermaßen in SW 41-Röhrchen vorbereitet: Je 2.1 ml von 50,45,40,35 und 30%iger Sucroselösungen (Gew.%) werden über einem "Kissen" (0.5 ml) von 55%iger Sucrose aufgeschichtet. Alle Sucroselösungen enthalten 5 mM EDTA pH 7.5. Anschließend wird 1 ml Membransuspension in 25%iger

Sucrose oben auf den Gradienten geschichtet (Membrane von ungefähr 500 ml logarithmisch gewachsenen Zellen können pro ml aufgenommen werden). Zentrifugiert wird bei 35,000 upm für 12-16 Std. bei 4°C.

Nach der Zentrifugation lassen sich die Membranbanden deutlich erkennen. Das Röhrchen wird unten angestochen und 25 Tropfen-Fraktionen (ungefähr 0.38 ml) werden gesammelt. Eine Proteinbestimmung mit der Ninhydrinmethode zeigt die Positionen der Membranbanden an. Radioaktivitätsmessungen werden durchgeführt wie beschrieben in 2.1. Der Verunreinigungsgrad der äußeren Membran mit Cytoplasmamembran kann festgestellt werden durch Aktivitätsbestimmung der Succinatdehydrogenase (ein ausschließlich in der Cytoplasmamembran vorkommendes Enzym).

Die Membrane enthaltenden Fraktionen werden gesammelt, mit Wasser verdünnt und bei 140,000 g für 2 Std. bei 4°C abzentrifugiert.

2.5.2 Trypsinmethode (20)

Die Anfangsschritte bis zur Plasmolyse in hypertonischer Sucroselösung werden durchgeführt wie für die Osbornmethode beschrieben. Lysozym wird nicht zugesetzt, aber 1.5 Volumina 1.5 mM EDTA pH 7.5 werden langsam in die Zellsuspension gepumpt. Erst nachdem die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen und noch verbliebene ganze Zellen durch Zentrifugation (1500 mg, 20 Min.) entfernt worden sind, wird das restliche 0.5fache Volumen 1.5 mM EDTA pH 7.5 zugegeben. Die Zellhüllen werden bei 140,000 g 2 Std. 4°C abzentrifugiert und anschließend in soviel 0.01 M Tris-maleat,

0.01 M EDTA pH 8.0 aufgenommen, daß die O.D. der Zellhüllensuspension ungefähr bei 0.7 liegt. Trypsin (kristallisiert, salzfrei, mit Diphenylcarbomylchlorid behandelt, um Chymotrypsin zu inaktivieren, von Serva, Heidelberg) wird bis zu einer Endkonzentration von 33 µg/ml zugesetzt (0.1 ml einer 1 mg/ml Lösung in Wasser wird pro 3 ml Zellhüllensuspension zugegeben). Nach Inkubation bei Zimmertemperatur für 2-5 Min. wird die Reaktion gestoppt durch Zugabe einer doppelten Menge Soyabohnen-Trypsininhibitor (3 x kristallisiert, von Worthington, Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey). Trypsin bewirkt ein schnelles Absinken der optischen Dichte der Zellhüllensuspension auf ungefähr 60%. Dieses Absinken hat seine Ursache in der Trennung der inneren und äußeren Membran. Die Trypsin-gespaltenen Membrane werden abzentrifugiert bei 140,000 g für 2 Std. 4°C und innere und äußere Membrane voneinander getrennt auf einem Sucrosedichtegradienten, wie beschrieben.

2.6 Charakterisierung von radioaktiven Produkten

2.6.1 Extraktion

Lipidgebundene Zwischenprodukte können spezifisch extrahiert werden (2). Das Volumen einer geeigneten Menge Membran - oder Zellhüllensuspension wird mit Wasser auf 0.5 ml gebracht und mit einem gleichen Volumen Butan-1-ol: 6 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1, V/V) extrahiert. Nach kräftigem Mischen werden die Phasen durch Zentrifugation getrennt und die organische Phase abgesaugt. Diese Behandlung wird einmal wiederholt, bevor die wässrige Phase anschließend mit 0.5 ml wassergesättigtem Butan-

1-ol extrahiert wird. Die organischen Phasen werden vereint, zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen, nochmals eingeengt und in einem kleinen Volumen Wasser suspendiert. Das Volumen der wässrigen Phase wird auf ungefähr 2 ml aufgefüllt, wodurch die schwimmende Interphase in Suspension geht. Die Suspension wird mit Ultraschall dispendiert. Zentrifugation bei 140,000 g (2 Std. bei 4°C) ergibt ein Sediment, das den größten Teil der Radioaktivität der wässrigen Phase enthält. Sowohl das in der organischen Phase extrahierte Produkt als auch das in der wässrigen Phase verbliebene Produkt werden charakterisiert wie unten beschrieben.

2.6.2 Lysozym- und Pronase-Spaltung

Geeignete Proben werden gut suspendiert in 0.01 M Tris-HCl pH 7.5 und mit Lysozym (Enzym:Protein 1:10; Enzym von Serva, Heidelberg) bei 37°C für 5-15 Std. oder mit Pronase P (Protease aus Streptomyces griseus, Serva, Heidelberg) bei 60°C für 1-4 Std. gespalten.

2.6.3 Schwache Säurehydrolyse

Die Pyrophosphatbindung zwischen Lipidträger und Muropeptiden wird durch schwache Säurehydrolyse geöffnet (2). Die Proben werden auf 0.1 M HCl eingestellt und bei 105°C 15 Min. inkubiert.

2.6.4 Freisetzung des Lactylpentapeptids

Wenn das reduzierende Ende von Muraminsäure frei ist, bewirkt Behandlung mit Alkali eine Freisetzung des D-Lactatrestes (43). Die beteiligten Teilreaktionen sind in Abb. 4 dar-

gestellt. Geeignete Proben, die zum Teil vorher einer schwachen Säurehydrolyse unterzogen worden sind, werden lyophilisiert, um HCl zu entfernen. Nach Zugabe von 100 µl 4 M NH_3 werden die Proben bei 37°C 6 Std. inkubiert. Die so gebildeten Produkte werden anschließend papierchromatographisch identifiziert.

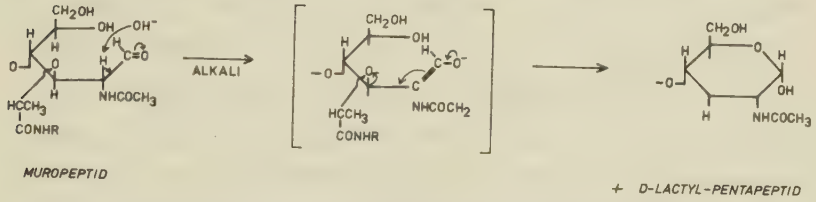


Abb. 4 Freisetzung des D-Lactat-Pentapeptids durch Alkali
Der geschilderte Reaktionsweg ist zitiert unter (43).

2.6.5 Papierchromatographie

Die Identifizierung der radioaktiven Produkte erfolgt durch absteigende Papierchromatographie auf Whatman Nr. 3-Papier. Zwei Chromatographiesysteme werden benutzt (41): a) Isobuttersäure: 0.5 M NH_4OH (5:3) und b) Äthanol: 1 M Ammoniumacetat (7.5:3). Die Laufzeit beträgt jeweils 12-13 Std. Nach sorgfältigem Trocknen werden 2cm^2-Stücke herausgeschnitten und die darin enthaltene Radioaktivität in 5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit (0.28% PPO, 0.09% POPOP) gemessen.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Präparation von Antiseren

i) Gegen Lipoprotein

Die Immunisierungsmethode sowohl für Lipoprotein, erhalten nach Lysozym-Spaltung von M-MLP (Abschnitt 2.3.1) als auch

für Lipoprotein aus der Trypsin-Spaltung von M-MLP (Abschnitt 2.3.2) ist die gleiche. Von der Ohrvene jedes Kaninchens werden 3 ml Blut in eine sterile Spritze gezogen, die 1 ml 3.1%iges Natriumcitrat enthält (Drobena Arzneimittel, Erich Heinze, Berlin). Die Erythrozyten werden dreimal mit kalter, phosphatgepufferter Saline gewaschen (100 ml 0.9% NaCl, 23.9 ml 0.15 M KH_2PO_4, 76 ml 0.15 M Na_2HPO_4). Sie werden dann bei 37°C mit 3 ml dieser Lösung, zu der noch 500 ug Alkali-behandeltes Lipoprotein zugegeben wird (siehe Abschnitt 2.7.2 für die Beschreibung des Alkali-Solubilisierungsverfahrens) für 1 Std. inkubiert. Danach werden die Lipoprotein-beschichteten Erythrozyten erneut dreimal mit 5 ml phosphatgepufferter Saline gewaschen, in 1 ml dieser Lösung suspendiert und in die Ohrvene des Kaninchens zurückgespritzt.

Die Kaninchen werden am Tage 0, 3 und 8 immunisiert. Wenn die Immunisierung erfolgreich verlaufen ist, werden ungefähr 30 ml Blut am Tage 12 entnommen. Nach Gerinnen des Blutes wird das Serum abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

ii) Gegen hitzegetötete Bakterien

E.coli B/r-Zellen, die in TB-Medium bis zur stationären Phase gewachsen sind, werden in einem Dampfbad 2 Std. lang inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit phosphatgepufferter Saline gewaschen und im Anfangsvolumen dieses Puffers wieder aufgenommen. Am Tage 0, 3 und 8 wird 1 ml der Zellsuspension intravenös gespritzt. Der gegen Lipoprotein gerichtete Titer wird durch passive Hämagglutination mit Lipoprotein-beschichteten Erythrozyten festgestellt.

2.7.2 Solubilisierung von Lipoprotein

Bevor das Lipoprotein zum Beschichten von Erythrozyten verwendet werden kann, muß es durch eine Alkali-Behandlung solubilisiert werden, da es in Puffer normalerweise relativ unlöslich ist. Dazu werden 5 mg Lipoprotein in 0.5 ml 0.1 M NaOH aufgenommen, bei 56°C für 1 Std. inkubiert und sorgfältig mit 0.1 M HCl neutralisiert. Außerdem werden geeignete Mengen von Zellfraktionen in dieser Weise solubilisiert, bevor sie auf immunologische Kreuzreaktion getestet werden.

2.7.3 Beschichten von Erythrozyten mit Lipoprotein

Menschliche Erythrozyten werden dreimal mit kalter, phosphatgepufferter Saline gewaschen. 0.1 ml des viskösen Erythrozyten-Sediments werden in 10 ml der Lösung, die 400 µg alkali-solubilisiertes Lipoprotein enthält (entweder "Lysozym-Lipoprotein" oder "zuckerfreies Lipoprotein") aufgenommen. Langsames Rühren dieser Suspension für 1 Std. bei 37°C führt zu einem Beschichten der Erythrozyten mit Lipoprotein, ohne daß ein koppelndes Agens zugesetzt werden muß. Die beschichteten Erythrozyten werden dreimal mit phosphatgepufferter Saline (für passive Hämagglutination) oder mit isotonischem Veronal pH 7.3 (28) (für Immunhämolyse-Inhibierung) gewaschen.

2.7.4 Passive Hämagglutination

Antikörper, die gegen Erythrozytenoberflächen-Komponenten gerichtet sind, können, in genügender Menge vorhanden, zur Hämagglutination führen. Bei niedrigerer Antiserumkonzentration

agglutinieren die Zellen nicht, sondern setzen sich einfach auf dem Gefäßboden ab. In Gefäßen von geeigneter Form kann man sehr einfach zwischen agglutinierten und abgesetzten Erythrozyten unterscheiden. Der Titer kann bestimmt werden durch die stärkste Antiserumverdünnung, die noch Agglutination hervorruft.

0.1 ml Erythrozyten, mit Lipoprotein beschichtet, (siehe Abschnitt 2.7.3), werden in 20 ml phosphatgepufferter Saline suspendiert. Eine sich verdoppelnde Antiserum-Verdünnungsreihe wird angesetzt in Cooke Murotiter Platten (C.A. Greiner, 7440 Nürtingen) mit der Verdünnungsvorrichtung von Takátsy (Ungarisches Außenhandelsunternehmen für Erzeugnisse der Instrumentenindustrie, Budapest 62, Postfach 202). Das Probenvolumen ist 50 µl und 50 µl Erythrozytensuspension werden zugesetzt. Nach Inkubieren der Platten bei 37°C für 1 Std. wird der Titer bestimmt. Die Genauigkeit dieser Methode ist niedrig ($\pm$ 100%).

2.7.5 Immunhämolyse-Inhibierung

Mit dem Namen Komplement bezeichnet man eine Gruppe von Serum-Enzymen, die mit Antigen-Antikörper-Komplexen reagieren. Wenn diese Komplexe sich an Zelloberflächen befinden, bewirkt Komplement ein Lysieren der Zellen. Bei konstanten Mengen von Antigen und Komplement ist das Ausmaß der Lyse proportional zur Antikörperkonzentration. Lyse von Erythrozyten setzt Hämoglobin frei, das wegen seiner Absorption bei 412 nm Wellenlänge quantitativ bestimmt werden kann.

Lipoprotein-beschichtete Erythrozyten werden so in 0.15%igem

Rinderserum-Albumin enthaltenden isotonischen Veronal aufgenommen, daß 0.1 ml der Zellsuspension in 1.4 ml H_2O eine Absorption von ungefähr 1.3 bei 405 nm ergibt. Meerschweinchen-Komplement (lyophilisiert, von Serva, Heidelberg) wird in Veronal-NaCl so verdünnt, daß unter den Versuchsbedingungen die höchste Antiserumkonzentration in der Verdünnungsreihe ungefähr 90% Hämolyse hervorruft. 0.15%iges Rinderserum-Albumin stabilisiert sowohl Erythrozyten als auch Komplementproteine. Die Komplementlösung wird für nicht länger als einen Monat bei -20°C aufbewahrt. Endogenes Komplement, das im Anti-Lipoproteinserum vorhanden ist, wird durch Erhitzen zerstört (56°C für 1 Std).

Der Test wird wie in (3) und (21) beschrieben durchgeführt. Eine sich verdoppelnde Antiserum-Verdünnungsreihe wird angesetzt mit einem Probenvolumen von 0.1 ml. Nach Zugabe von 0.1 ml einer geeigneten Verdünnung von Lipoprotein oder Zellfraktion werden die Proben bei 37°C 15 Min. lang langsam geschüttelt. Danach werden 0.1 ml Erythrozyten-Suspension und 0.1 ml Komplement-Lösung zugegeben. Die Inkubation bei 37°C wird fortgesetzt, aber jetzt mit kräftigem Schütteln. Anschließend wird jede Probe mit 1 ml kaltem Veronal-NaCl verdünnt, bei 6000 g für 10 Min. zentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 405 nm gemessen.

Der Verlauf der Absorption bei 405 nm wird gegen die Antiserum-Verdünnung aufgetragen. Die Fläche unter der Kurve ist proportional zur Menge an Antikörpern. Das bedeutet also, daß die Antikörper-Menge, die vom zugesetzten Lipoprotein oder von der zugesetzten Zellfraktion inhibiert worden ist, durch

den Flächenunterschied zwischen den Kurven ohne (100%) und mit Zugabe von Lipoprotein oder Zellfraktion wiedergegeben wird. Die Inhibierung mit bekannten Mengen Lipoprotein ergibt Standardkurven, anhand derer dann die Menge Lipoprotein in einer Zellfraktion bestimmt werden kann.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Sequenzanalyse des Lipoproteins

Der Murein-Sacculus wird von den E.coli Zellhüllen durch Lösen der Zellwandproteine und -Lipide in siedender 4% SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat) isoliert. Das unlösliche Mureingerüst wird abzentrifugiert. Die Aminosäureanalyse ergibt stets neben den mureinspezifischen auch andere Aminosäuren, außerdem sind Lipide mit dem Murein-Sacculus verknüpft (7,9,10). Diese Komponenten können weder durch weiteres Auswaschen mit heißem 4%igen SDS noch durch Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln entfernt werden. Die Lipide verbleiben am Proteinteil, wenn dieser durch Proteasen vom Murein abgespalten wird. Die konstante Zusammensetzung dieses unlöslichen Materials führten zur Annahme, daß einzelne strukturell identische Lipoprotein-Moleküle, mit kovalent gebundenem Lipid, durchschnittlich an jede 10. bis 12. repetitive Mureineinheit kovalent gebunden sind (8). Um diese Hypothese zu bestätigen und die Möglichkeit auszuschließen, daß das Protein nicht aus Verunreinigungen verschiedener Zellhüllenproteine herrührt, mußte die gesamte Aminosäuresequenz des Lipoproteins geklärt werden. Von speziellem Interesse sind die Bindungsstellen des kovalent gebundenen Lipids und Mureins an der Polypeptidkette. Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin und chemische Agenzien wie Bromcyan geben keine signifikanten, charakterisierbaren Spaltprodukte des Murein-Lipoproteinkomplexes oder des durch Lysozymbehandlung freigesetzten Lipoproteins. Erst als die komplette Primärstruktur

anderweitig aufgeklärt war, wurden die Gründe sichtbar. Die Aminosäuresequenz läßt mit hoher Wahrscheinlichkeit α-Helixstruktur vermuten, die durch Messungen des Zirkulardichroismusses bestätigt wurden (siehe Seite 40). Bekanntlich sind α-helikale Bezirke in Proteinen von Proteasen schwer angreifbar. Obendrein sind Teile des Polypeptids sehr wahrscheinlich durch Murein und Lipid geschützt.

Pronase, Subtilisin und Thermolysin vermögen jedoch den Murein-Lipoprotein-Komplex zu spalten. Drei verschiedene Spaltprodukte bilden sich, die wie folgt getrennt werden: a) der pH der Suspension wird bis etwa 8,5 erhöht (um das Präzipitieren von Lipopeptiden zu vermeiden), das ungespaltene Murein wird durch einstündiges Zentrifugieren bei 18 000 g entfernt und mit Wasser oder wenn nötig mit 4%igem SDS ausgewaschen. Die Aminosäureanalyse zeigt, daß zwei Reste, nämlich Lysin und Arginin am Murein gebunden bleiben, d.h. Arginyl-(6-murein)-Lysin vorliegt. Partielle Säurehydrolyse dieses Arginyl-(6-murein)-Lysins läßt Peptide entstehen, mit deren Hilfe man die exakte Natur der Bindungen an das Murein aufklären kann.

b) Wird der pH der Lösung auf 3,2 erniedrigt, fallen Lipopeptide aus, die bei längerem Stehen noch weiter ausflocken und durch Zentrifugation gewonnen werden. Die Natur der Bindung von Lipid zu Polypeptid in diesen Lipopeptiden und die Aminosäuresequenz in unmittelbarer Nachbarschaft dazu, konnte von Hantke und Braun (22) ermittelt werden.

c) Der Überstand nach den beiden erwähnten Zentrifugationen ent-

hält die durch Proteasen freigesetzten löslichen Peptide. Auch partielle Säurehydrolyse von Lipoprotein in 4 n HCl (100°C, 1 Std.) ergibt lösliche Peptide und unlösliche Lipopeptide, die durch Zentrifugieren entfernt werden können. Die Trennung dieser Peptide und Aufklärung ihrer Aminosäuresequenz ergeben die Primärstruktur des Lipoproteins.

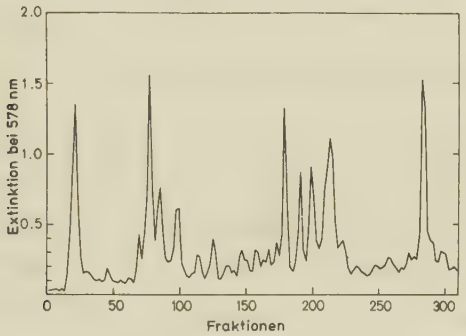


Abb. 4 Trennung der Peptide an Dowex 50x2 nach Pronase-Spaltung des Murein-Lipoproteins.

Säulengröße 60x2 cm; T=50°C; Durchfluß 20 ml/Std., 5 ml Fraktionen. Äquilibrierungspuffer im 250 ml Mischgefäß ist 0,1 M Pyridin-Formiat, pH 3,0, es folgen (1) 0,25 M Pyridin-Formiat pH 3,2 (2) 0,5 M Pyridin-Formiat pH 3,4 (3) 1 M Pyridin-Formiat pH 3,7 (4) 1 M Pyridin-Formiat pH 5,0 und (5) 2 M Pyridin-Formiat pH 5,0.

Die Trennung der löslichen Peptide erfolgt durch Chromatographieren des gesamten Peptidgemisches an Dowex 50x2 oder Dowex 1x2

Säulen (Abb. 4 zeigt ein Beispiel). Man erhält mehr als 20 Gipfel, deren Reinheit durch absteigende Papierchromatographie überprüft wird. Saure und neutrale Peptide werden in n-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5, Vol.) getrennt, basische in Methanol, Wasser, Pyridin, konz. HCl (80:17,5:10:2,5, Vol.). Nach Anfärben der Flecken mit 0,5% Ninhydrin in Aceton wird ersichtlich, daß jeder der 20 Gipfel zwischen 2 und 6 Peptiden enthält, d.h., daß die Zahl der Peptide größer ist als die Anzahl der im Lipoprotein enthaltenen Aminosäuren.

Die Gipfel der ersten Trennung werden auf Dowex 50x2, Dowex 1x2 und Phosphocellulose rechromatographiert. Die Reinheitsprüfung erfolgt wiederum papierchromatographisch, beim Vorliegen eines Fleckes, in Übereinstimmung mit der Aminosäureanalyse, wird auf ein einzelnes Peptid geschlossen. Auf diese Weise konnten 59 Peptide rein isoliert werden. Zum Sequenzieren der Peptide wurde der"subtraktive Edmanabbau" benützt. Bei dieser Methode wird nach jedem Abbauschritt die Aminosäurezusammensetzung des verbleibenden Restpeptids ermittelt.

Die Methode erlaubt den zweifelsfreien Nachweis von etwa 4 bis 5 Abbauschritten. N-terminale Aminosäuresequenzen können mit Aminopeptidase M (37) ermittelt werden, C-terminale Sequenzen mit Carboxypeptidase A und B (1), insbesondere Asparagin und Glutamin können auf diese Weise nachgewiesen werden. Bilden diese Aminosäuren den C-Terminus eines Peptids, so können sie beim letzten Schritt des Edmanabbaus direkt auf dem Aminoläureanalysator nachgewiesen werden.

Tabelle 1 zeigt ein Beispiel einer Sequenzermittlung eines Peptides. Eine vollständige Zusammenstellung aller sequenzierten Peptide wurde bereits publiziert (5,6).

Tabelle 1: Aminosäuresequenz des Thermolysin-Peptids 7 (siehe (6)).

		1. Ed.	2. Ed.	3. Ed.	4. Ed.
Asx	1.26	1.41	1.26	1.10	0.42
Thr	0.98	1.02	1.01	1.05	1.15
Ser	1.97	2.06	1.13	0.20	0.21
Glx	0.97	1.11	1.04	0.94	1.06
Val	0.76	0.81	0.81	0.91	0.79
Leu	1.07	-	-	-	-

Carboxypeptidase A ergibt nach 10 Min.: 1,0 Thr, 0,1 Gln; nach 45 Min.: 1,0 Thr, 1,0 Gln. Ein Abbauprodukt wird zusammen mit der Aminosäure Valin eluiert und verhindert die Auswertung. Aminopeptidase M ergibt nach 60 Min. 1,0 Leu, 1.15 Ser. Als Sequenz ergibt sich: Leu-Ser-Ser-Asx-Val-Gln-Thr.

Die Strukturermittlung des C-terminalen Endes des Lipoproteins, besonders die Bindungsstelle an das Murein war schwieriger, die Resultate werden im folgenden eingehender erläutert.

3.2 Struktur der Bindung des Lipoproteins an das Murein

Die Isolierung von Peptiden, die Lysin, Arginin, Diaminopimelinsäure sowie die anderen Aminozucker einer einzelnen repetitiven Mureineinheit enthalten, wurde früher beschrieben (9,10). Diese Peptide (siehe a-c unten) wurden neu aus dem Murein isoliert, das nach Pronasespaltung des Murein-Lipoproteinkomplexes zurückbleibt. Die Peptide a und b wurden nach partieller Säurehydrolyse des "Pronase-Mureins" rein isoliert, das Peptid c hingegen nach Lysozymbehandlung des "Pronase-Mureins".

a) NH_2-Arg-Lys-COO^-
NH_2-Dap—┘ ε

b) NH_2-Arg-Lys-COO^-
NH_2-Ala-Glu-Dap—┘ ε

c) NH_2-Arg-Lys-COO^-
┌Ala-Glu-Dap—┘ ε
└MurNAc-GlcNAc

Die hier vorliegende Analyse dieser Peptide bestätigt die bereits erhaltenen Daten, bringt aber zusätzlich neue Erkenntnisse, die die Natur der chemischen Bindung des Lipoproteins an das Murein restlos klärt.

Im folgenden werden die bereits vorliegenden Ergebnisse und sich daraus ergebenden Rückschlüsse über die Natur dieser Bindung kurz erläutert: - Ein wichtiges Indiz war die Beobachtung, daß in der intakten Zellhülle die Bindung zwischen Lipoprotein und Murein von Trypsin leicht angreifbar ist (7).

Die Extinktion der Zellhüllensuspension nimmt bei Zugabe von Trypsin rasch ab. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß die cytoplasmatische Membran sich von der äußeren Membran gelöst hat. Die Analyse des isolierten Mureinsacculus ergibt, daß das Lipoprotein abgespalten wurde. Nur die Aminosäure Lysin bleibt gebunden. Bei der Pronase-Spaltung des Murein-Lipoprotein-Komplexes bleiben am Mureinsacculus nur Lysin und Arginin gebunden. Man schloß daraus, daß Lysin, von einem Arginin benachbart, das bindende Glied zwischen Murein und Lipoprotein ist. Es wurde gezeigt, daß Carboxypeptidase B aus den Peptiden a und b Arginin freisetzt (9), dieses also C-terminal in den Peptiden vorliegen muß. Es wurde gefolgert, daß das Arginin in normaler Peptidbindung zur Carboxylgruppe des N-terminalen Lysins des Lipoproteins vorliegt. Das Lipoprotein ist also über die ε-Aminogruppe seines N-terminalen Lysins an eine der Carboxylgruppen der Diaminopimelinsäure gebunden. Beim Edmanabbau zeigt sich (10), daß die Carboxylgruppe des optisch aktiven L-Zentrums der Diaminopimelinsäure diese Carboxylgruppe ist, d.h. das Lipoprotein ersetzt in dieser Position das normalerweise vorhandene D-Alanin (siehe 10 und folgendes). Der Befund, daß ein einzelner Edmanabbau in den Peptiden a und b zu einem Verlust des Arginins führt, konnte nicht erklärt werden; das klare Ergebnis der Carboxypeptidase B-Spaltung ließ zu diesem Zeitpunkt jedoch kaum Zweifel an der C-terminalen Position des Arginins in diesen Peptiden zu.

Nachdem jedoch die gesamte Aminosäuresequenz bis zum Arginin in Position 57 aufgeklärt worden war, war diese Interpreta-

tion nicht länger möglich. Wie aus der Aminosäurezusammensetzung des Lipoproteins hervorgeht, fehlt nur ein Lysin, das an das C-terminale Arginin 57 gebunden sein muß. Diese Aminosäure muß deshalb in den Peptiden a, b und c in N-terminaler Position vorliegen. Um die widersprüchlichen Ergebnisse zu klären, werden die Peptide nocheinmal detailliert analysiert.

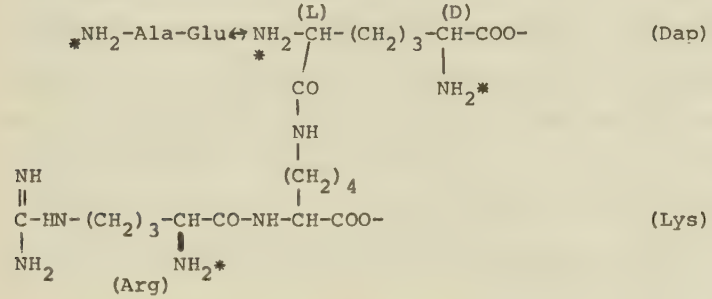
Tabelle 2 Edmanabbau der Peptide a und b

			Ed.1	Ed.1+	Ed.2
Peptid a	Lys	1.01	1.00	0.50	0.20
	Arg	0.98	0.29	0	0.20
	Dap	1.01	0	0	0
Peptid b	Lys	1.04	1.03	0	0.31
	Arg	1.06	0.20	0	0
	Glu	1.01	0.97	0	n.b.
	Ala	0.93	0.19	0	n.b.
	Dap	0.96	0.08	0	n.b.

+Ohne Säurehydrolyse

Die Ergebnisse des Edmanabbaus der Peptide a und b zeigt die Tabelle 2. Ein einzelner Edmanabbau an diesen Peptiden führt zum Verlust von Arginin, und bestätigt damit die N-terminale Position dieser Aminosäure, die deshalb auch mit dem Arginin in Position 57 des Lipoproteins identisch sein muß. Beim Edmanabbau ohne Säurehydrolyse wird von Peptid a Lysin freigesetzt, jedoch nicht von Peptid b. Daraus folgt, daß Lysin an die Carboxylgruppe des L-Zentrums der Diaminopimelinsäure gebunden ist. Diese Carboxylgruppe ist der Aminogruppe der Diaminopimelin-

säure benachbart, die Glutamin bindet. Nur in Peptid a, das kein Glutamin enthält, führt die Zyklisierung zum Thiazolinon zur gleichzeitigen Freisetzung von Lysin. Im folgenden Formelschema sind die für die Zyklisierung des Edmanabbaus angreifbaren Aminogruppen durch * gekennzeichnet, die gestrichelt gezeichneten Bindungen werden gebrochen.



In einer vorausgehenden Publikation (10) wurde beschrieben, daß das nach einem Edmanabbau aus Peptid b entstehende und gereinigte Peptid immer noch lysinhaltig ist. Auch daraus geht hervor, daß das Lipoprotein tatsächlich D-Alanin am optisch aktiven L-Zentrum der Diaminopimelinsäure ersetzt. Da man zu diesem Zeitpunkt annahm, daß das Arginin C-terminal vorliegt, wurde gefolgert, daß die Bindung mit der ε-Aminogruppe des N-terminalen Lysins geknüpft würde. Wie oben gezeigt, ist das Lysin jedoch am C-Terminus des Lipoproteins und die Bindung an die Diaminopimelinsäure erfolgt über seine ε-Aminogruppe, wie auch aus dem Formelschema zu ersehen ist.

Ein zweiter Schritt des Edmanabbaus führt zum Verlust von

Lysin in beiden Peptiden. Dies bestätigt, daß Lysin mit seiner α-Aminogruppe an Arginin und mit seiner ε-Aminogruppe an die Diaminopimelinsäure gebunden ist. Obendrein besitzt Peptid b N-terminales L-Alanin, wie aus dem ersten Edmanabbau hervorgeht (siehe Tabelle 2), erst nach dem zweiten Schritt verschwindet die D-Glutaminsäure. Eine Spaltung des Peptides b mit Aminopeptidase M (5 Std., 37°C) macht die N-terminale Position des Arginins (85% werden freigesetzt) ebenfalls ersichtlich. Es erfolgt keine Freisetzung von Alanin. In Nachbarschaft zur Alanin- Glutaminsäurebindung befindet sich die freie α-Carboxylgruppe der Glutaminsäure. Erfahrungsgemäß werden Aminosäuren mit Carboxylgruppen in den Seitenketten aus Peptiden von Aminopeptidase M nur sehr langsam hydrolysiert, wie auch in der Literatur beschrieben (14).

Die Spaltung mit Carboxypeptidase B bestätigt frühere Ergebnisse, so werden z.B. nach 4,5 Std. 64% Arginin von Peptid b und eine ähnliche Menge von Peptid a freigesetzt. Daraus muß geschlossen werden, daß in einem Arginyl-Lysinpeptid, wenn die ε-Aminogruppe des Lysins blockiert ist, die Carboxypeptidase B Arginin abspaltet. Im Gegensatz dazu wird die Bindung bei Hippuryl-6-benzyloxycarbonyl-L-lysin nicht gespalten (16). Im Peptid Arginyl-(-diaminopimelyl)-lysin paßt die positiv geladene α-Aminogruppe des Arginins oder wahrscheinlicher die Guanidinogruppe in die aktiven Zentren des Enzyms, wobei die freie Carboxylgruppe des Lysins immer noch erkannt wird. Da aus beiden Peptiden etwa gleichviel Arginin freigesetzt wird, spielt anscheinend die Länge der Seitenkette an der ε-Aminogruppe des Lysins keine große

Rolle.

Um die Sequenz Arginyl-(6-Diaminopimelyl)-Lysin abzusichern, werden die freien Aminogruppen mit Dinitrofluorbenzol bestimmt. Es werden nur mono-Dinitrophenyl-Diaminopimelinsäure, di-Dinitrophenyl-Dps und mono-Dinitrophenyl-Arginin gebildet (Abb. 5), jedoch kein Dinitrophenyl-Lysin. Die beiden Aminogruppen der Diaminopimelinsäure und die Aminogruppe des Arginins sind also frei, die Aminogruppen des Lysins sind blockiert.

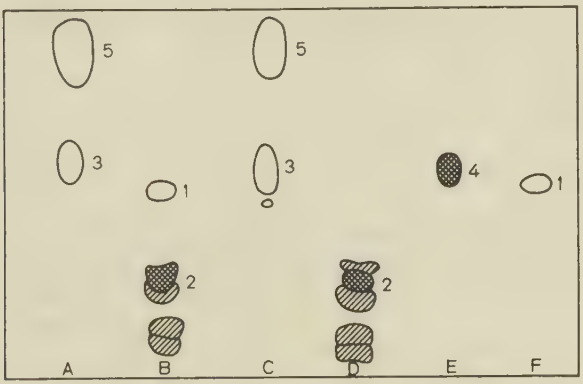


Abb. 5 Trennung der Dinitrophenylderivate des Peptids Arginyl-(6-Dap)-Lysin.

Identifizierte Flecken (Dnp = Dinitrophenyl): (1) Dnp-Arginin, (2) mono-Dnp-Diaminopimelinsäure, (3) di-Dnp-Dap, (4) ε-Dnp-Lysin, (5) Dinitrophenol. Die leeren Flecken sind Dnp-Produkte, die gestrichelten Flecken sind Ninhydrin-positive, keine Dnp-Derivate enthaltende Flecken und die zweifach gestrichelten Flecken sind ninhydrinpositiv und dinitrophenyliert. C und D sind Äther- bzw. Wasser-lösliche Dnp-

Diaminopimelinsäurederivate, E und F sind Referenz-Dnp-Derivate. A und B sind die im Wasser bzw. Äther löslichen Produkte, die nach Dinitrophenylierung von Peptiden erhalten werden.

3.3 Diskussion der vollständigen Struktur des Lipoproteins

Abbildung 6 zeigt die gesamte Aminosäuresequenz des Murein-Lipoproteins mit der Bindung des Mureins am C-terminalen Ende und des Lipids am N-Terminus (22). Die Sequenz zeigt sich wiederholende Strukturen; im unteren Teil von Abbildung 6 ist sie nach maximaler Homologie innerhalb der Polypeptidkette angeordnet.

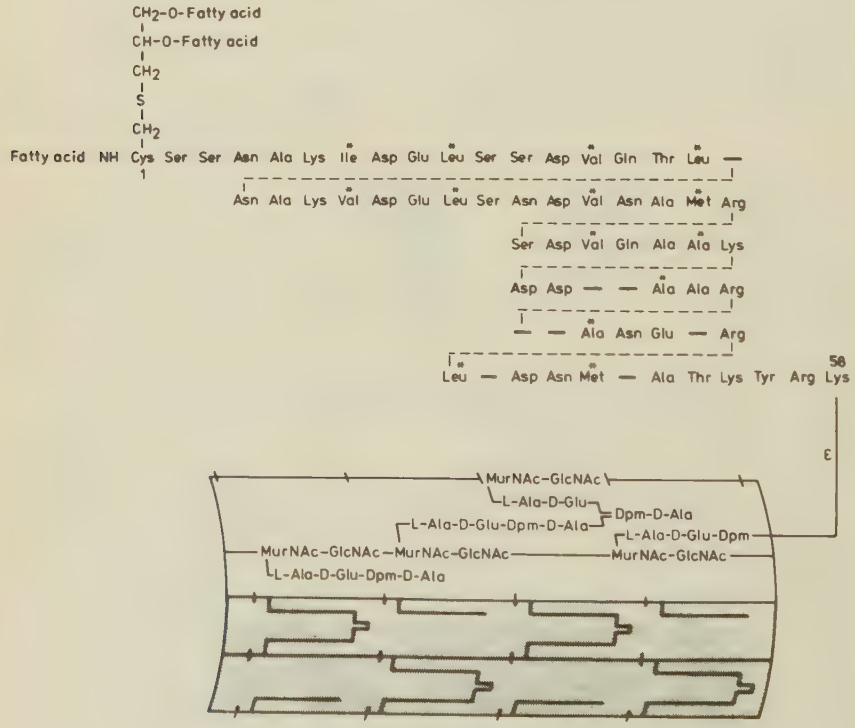


Abb. 6 Struktur des Murein-Lipoproteins

Der zylindrische Teil soll Murein darstellen, wie es in dem stäbchenförmigen Bakterium E.coli vorliegt. Die Lipoproteinmoleküle sind durchschnittlich an jede 10. bis 12. sich wiederholende Mureinuntereinheit gebunden und ersetzen D-Alanin der Peptidseitenkette. Die Anordnung der Aminosäuresequenz ist so gewählt, daß maximale Homologie entsteht. Die * markieren die hydrophoben Reste an jeder 3. bzw. 4. Position.

Die Aufklärung dieser Primärstruktur schließt gleichzeitig auch die Möglichkeit aus, daß das mit dem isolierten Murein entdeckte Protein aus einer Verunreinigung durch verschiedene Zellhüllenproteine herrührt. Das Modell, daß einheitliche Lipoproteinmoleküle von identischer Struktur, die alle kovalent gebundenes Lipid enthalten, mit jeder 10. - 12. sich wiederholenden Mureineinheit in kovalenter Bindung verknüpft sind, hat sich damit bestätigt.

Weiterhin zeigt die aufgeklärte Struktur einige interessante Merkmale. Wie oben gezeigt, ist die Sequenz in großem Maße repetitiv. Von der 4. Aminosäure ausgehend (AsN) wiederholt sich eine 14 Aminosäuren umfassende Sequenz durch eine nahezu identische mit 15 Aminosäuren der sich wiederum eine ähnliche, 7 Aminosäuren umfassende Sequenz anschließt. Das Strukturgen kodierte wahrscheinlich ursprünglich für 15 Aminosäuren, es verdoppelte sich und das Triplett für das C-terminale Lysin oder Arginin ging verloren. Dann vereinigte sich die Hälfte des ursprünglichen Gens mit dem verdoppelten Gen.

Im Protein folgen jetzt variablere Teile, deren abnehmende Ähnlichkeit mit dem ursprünglichen Gen augenfällig wird, wenn alle folgenden Peptide so angeordnet werden, daß sie entweder mit Lysin oder Arginin enden. Die Homologien sind unter Berücksichtigung einiger Deletionen immer noch deutlich (11).

Weiterhin ist ersichtlich, wenn man wiederum mit der 4. Aminosäure beginnt, daß unpolare Aminosäuren in Intervallen von 3 bzw. 4 Resten auftauchen und sich in regelmäßig alternierenden Abständen über die ganze Sequenz wiederholen. Nach Perutz, Kennedy und Watson (36) wiederholen sich unpolare Reste in α-helikalen Bereichen von Hämoglobinen und Myoglobinen in Abständen von 3.6 Aminosäuren. Die resultierende Helix enthält eine unpolare Seite, die dem Inneren des Globinmoleküls zugewendet ist. Die Sequenz des Lipoproteins legt analog α-helikale Konformation nahe; Messungen des Zirkulardichroismuss bestätigten dies. Der α-Helix-Gehalt wurde zu etwa 80% ermittelt (Braun und Hagenmaier, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

An beiden Enden der sich wiederholenden α-helikalen Peptidbereiche befinden sich Tripeptide besonderer Sequenz, welche wahrscheinlich Erkennungsorte für die Bindung des Lipids und des Mureins darstellen. Die N-terminale Sequenz Cys-Ser-Ser weist das einzige Cystein des Lipoproteins auf. Ein Diglyzeridrest wird über eine Thioester-Bindung an das Cystin gebunden und eine Fettsäure als Amid an die N-terminale Gruppe (22). Die C-terminale Sequenz Tyr-Arg-Lys besitzt das einzige Tyrosin des Lipoproteins. Das Lipoprotein wird über die ε-Aminogruppe des Lysins an das Murein gebunden.

3.4 In vivo Untersuchungen zur Biosynthese von Murein und Murein-Lipoprotein

Die Murein-spezifische Komponente Diaminopimelinsäure ist gleichzeitig die letzte Intermediär-Verbindung im Biosynthese-Weg zum Lysin. Daher wird ein Teil des Dap, wenn man es normalen Zellen anbietet, zu Lysin decarboxyliert und in Protein eingebaut. Die E.coli-Mutante W7 (23) jedoch ist eine Doppelmutante und besitzt nicht nur eine defekte Dap-Decarboxylase, sondern ist auch auxotroph für Dap. Zugabe von radioaktivem Dap zu diesen Mutantenzellen eröffent die Möglichkeit, den Biosynthese-Weg dieser Murein-spezifischen Komponente bis zu seinem endgültigen und spezifischen Einbau in fertiges Murein zu verfolgen.

Bevor jedoch auf die Probleme der Murein-Biosynthese eingegangen wird, soll zunächst eine erste Frage über den fertigen Murein-Lipoprotein-Komplex beantwortet werden.

3.4.1 Räumliche Lage des Lipoproteins ausgehend vom Murein.

Ein Lipoprotein ist im Durchschnitt an jeder 10. - 12. sich wiederholenden Untereinheit des Mureins gebunden (8). Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Lipoprotein-Moleküle sich vom Murein weg in Richtung der äußeren Membran, in Richtung der inneren (Cytoplasma-) Membran oder in beide Richtungen erstreckt (siehe Abbildung 7).

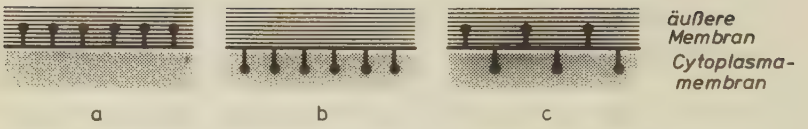


Abb. 7. Schematische Darstellung der Möglichkeiten, in welche Richtung(en) sich das Lipoprotein ausgehend vom Murein erstrecken könnte.

Die gepunktete Fläche repräsentiert die Cytoplasmamembran, die linierte Fläche die Äußere Membran und die dicke Linie dazwischen das Murein. Die drei Möglichkeiten a), b) und c) zeigen die Richtungen an, in welche das Murein-gebundene Lipoprotein sich erstrecken könnte.

Die Bindung zwischen Murein und Lipoprotein ist sehr empfindlich gegen Trypsin-Spaltung und im Elektronenmikroskop kann man beobachten, daß parallel zur Abspaltung des Lipoproteins vom Murein sich auch die Cytoplasmamembran von der äußeren Membran abtrennt (7). Es ist immer vermutet worden, daß diese beiden Effekte miteinander zusammenhängen. Die äußere Membran behält eine relativ starre Form, wogegen die Cytoplasmamembran oft zu einer kondensierteren Form schrumpft. Die naheliegende Interpretation dieses Befundes ist, daß das Lipoprotein sich vom Murein in Richtung der Cytoplasmamembran erstreckt und mit Komponenten in dieser Membran in Wechselwirkung steht. Andererseits zeigen jedoch elektronenmikroskopische Bilder der Zellwand von E.coli sphärische Untereinheiten von 120-140 Å Durchmesser unterhalb der äußeren

Membranschicht, aber oberhalb der Mureinschicht (15). Diese globulären Untereinheiten in der Zellwand sind hexagonal und gleichmäßig über dem Murein-Sacculus verteilt und könnten aus Protein oder Lipoprotein zusammengesetzt sein. Man ist versucht anzunehmen, daß es sich tatsächlich um Gruppen von Lipoproteinen handelt. Diese Ansicht und damit, daß das Lipoprotein sich vom Murein in Richtung der äußeren Membran erstreckt, ist trotz des Effekts von Trypsin-Spaltung immer favorisiert worden.

Die Entwicklung einer sehr wirksamen Methode von Osborn et al (34), die Cytoplasma- und äußere Membran voneinander zu trennen, eröffnete die Möglichkeit, diese Situation abzuklären. Die Methode besteht in der Bildung von Sphaeroplasten durch Plasmolyse in einer Sucrose-Lösung gefolgt von Lysozym-Spaltung in Gegenwart von EDTA. Die Sphaeroplasten werden dann aufgebrochen, die Membrane gewaschen und in einem Sucrose-Dichtegradienten in innere und äußere Membran getrennt. Es ist bekannt, daß Lysozym-Spaltung im Durchschnitt 2 sich wiederholende Einheiten von Murein auf dem Lipoprotein zurückläßt (10). Dies bedeutet, daß im Verlauf der Membran-Trennung die Produkte der Lysozymverdauung weggewaschen werden mit Ausnahme derer, die ans Lipoprotein gebunden bleiben. Auf diese Weise kann das an das Murein gebundene Lipoprotein in Zellen, mit ^{3}H-Dap gezüchtet, spezifisch markiert und seine Verteilung in den getrennten Membranen bestimmt werden.

E.coli W7-Zellen werden mit 0.33 μ Ci (3ug) ^{3}H-Dap für ungefähr zwei Generationen markiert, die Zellen dann abzentrifugiert und in Medium ohne Radioaktivität wieder aufgenommen. Sie

werden dann für weitere 2-3 Generationen gezüchtet, um sicherzustellen, daß alle Radioaktivität aus Murein-Vorstufen umgesetzt worden ist und ausschließlich als fertiges Murein vorliegt. Nach Trennung der cytoplasmatischen und äußeren Membran solcher Zellen mit der Osborn-Methode sieht man, daß die äußere Membran 10-20mal mehr Radioaktivität enthält als die Cytoplasmamenbran. Die geringe Radioaktivität, die in der Cytoplasmamembran verbleibt, kann auf Kontamination der Cytoplasmamembran durch die äußere Membran zurückgeführt werden. Eine Kontamination dieser Größenordnung, aber von der cytoplasmatischen zur äußeren Membran, kann ebenfalls gezeigt werden durch Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität (34). Da die gemessene Radioaktivität Lipoprotein repräsentiert, das zuvor an Murein gebunden war, ist klar, daß das Lipoprotein sich vom Murein in Richtung der äußeren Membran erstreckt, d.h. Möglichkeit a in Abb. 7 ist korrekt. Um den Effekt von Trypsin zu erklären, muß man annehmen, daß die Spaltung des Lipoproteins vom Murein in einer Konformationsänderung innerhalb der Zellhülle resultiert, was die Trennung der beiden Membrane zur Folge hat. Andererseits ist es möglich, daß die nach Trypsin-Behandlung beobachtete Membran-Trennung von einem unbekannten Effekt herstammt, der nichts mit der Spaltung des Lipoproteins zu tun hat.

3.4.2 Kinetik des Transfers der Murein-Vorstufen durch die Cytoplasmamembran

Grob ausgedrückt muß der Weg der Murein-Synthese folgender sein:

CYTOPLASMA ⟶ CYTOPLASMAMEMBRAN ⟶ ZELLWAND

(lösliche UDP-aktivierte Vorstufen) — (fertiges Murein)

Die Rate des Transfers durch die Cytoplasmamembran kann verfolgt werden durch Markierung der Zellen mit ^{3}H-Dap für sehr kurze Zeiten (Pulse), wodurch die Radioaktivität zum größten Teil in Murein-Vorstufen gebunden ist und anschließendem "Chase" mit einem großen Überschuß an nicht-radioaktivem Dap. Nach unterschiedlich langem Puls und "Chase" mit ^{3}H-Dap werden aus diesen Zellen die cytoplasmatische und äußere Membran präpariert und die Verteilung der Radioaktivität gemessen.

Da jedoch E.coli W7 bekanntlich einen großen cytoplasmatischen Pool an Dap besitzt (4), wurde befürchtet, dies könnte einen unvollständigen "Chase" zur Folge haben. Anstelle von E.coli W7 wurde in den Puls-Chase-Experimenten daher die Revertante E.coli W7-2 benutzt, die Dap wieder decarboxylieren kann und keinen Dap Pool besitzt. Allerdings müssen nun in den markierten Membranen ^{3}H-Dap und ^{3}H-Lysin voneinander getrennt werden. Dies geschieht auf kleinen Dowex 50x2 Säulen, wie in Material und Methoden beschrieben wurde.

Abb. 8 zeigt das Ergebnis eines solchen Puls-Chase-Experiments. Es ist sichtbar, daß nach einem sehr kurzen Puls von 15 Sek. nur 10% des insgesamt in der Zellhülle vorhandenen ^{3}H-Dap sich in der äußeren Membran befinden. Dies ist ^{3}H-Dap, das bereits in Murein eingebaut ist und nach der Lysozym-Spaltung, die für die Membrantrennung angewendet wird, an das Lipoprotein gebunden bleibt (daß diese Interpretation korrekt ist, konnte durch Gelelektrophorese bestätigt werden - siehe Abschnitt 3.4.3). 90% des gesamten in der Hülle vorhandenen ^{3}H-Dap befindet sich

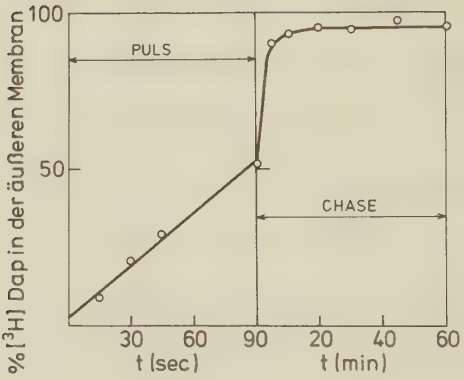


Abb. 8 Puls-Chase-Kinetik des Transfers von ^{3}H-Dap markierten Komponenten von der cytoplasmatischen zur äußeren Membran.

Das Experiment ist mit E.coli W7-2 durchgeführt, wie unter Material und Methoden beschrieben. Der Prozentanteil an ^{3}H-Dap-markierten Komponenten in der äußeren Membran bezogen auf Radioaktivität in der gesamten Zellhülle ist gegen die Zeit des Pulses (Sekunden) oder des "Chase" (Minuten) aufgetragen.

in der Cytoplasmamembran. Es repräsentiert Murein-Vorstufen auf dem Weg zu ihrem endgültigen Inkorporationsort in Murein. Wenn die Zellen für längere Zeit pulsmarkiert werden, nimmt der Anteil an ^{3}H-Dap in der äußeren Membran zu (z.B. sind es nach 90 Sek. über 50%). Dies zeigt, daß der Einbau von ^{3}H-Dap in

Murein-Vorstufen und fertiges Murein sehr rasch vor sich geht. "Chasing" mit nichtradioaktivem Dap für 5 Min. resultiert im Transfer von fast allem ^{3}H-Dap in die äußere Membran. Die immer noch in der Cytoplasmamembran feststellbaren 5% nehmen auch nach sehr langen "Chase"-Zeiten nicht weiter ab (z.B. 2.5 Generationen, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben). Dieser Anteil repräsentiert sicherlich eine Kontamination von der äußeren Membran. Ein vergleichbares Ergebnis erhielten Osborn et al (33) für die Lipopolysaccharid-Synthese in Salmonella typhimurium.

3.4.3 Membran-gebundene Vorstufen des Murein-Lipoprotein-Komplexes. Osborn-Methode.

Es ist in vitro gezeigt worden, daß die UDP-aktivierten Murein-Vorstufen, die an löslichen Enzymen im Cytoplasma synthetisiert werden (19,41), innerhalb der Zellhülle an einen Lipid-Träger (ein C_{55}-isoprenylphosphat) gebunden werden (27,44). Folglich kann man annehmen, daß dieser Lipid-Träger dazu dient, die Murein-Vorstufen, welche selbst in der Zellhülle nicht löslich wären, durch die Cytoplasmamembran zur Zellwand zu transportieren. Nicht beantworten können solche in vitro-Experimente detailliertere Fragen wie etwa, ob der Lipid-Träger mit seiner gebundenen Murein-Vorstufe selbst in die äußere Membran eindringt oder ob die Murein-Vorstufe in die äußere Membran entlassen wird, während der Träger in der Cytoplasmamembran zurückbleibt. Auch kann der ursprüngliche Ort der Polymerisation nicht bestimmt werden. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Polymerisation bereits in der Cytoplasmamembran beginnt und zur Produktion von Murein-

Strängen führt, die vielleicht immer noch an einen Lipid-Träger gebunden sind und die anschließend in Murein eingebaut werden. Diese Situation wäre vergleichbar zur Biosynthese der O-Antigen-Seitenketten der Lipopolysaccharide (42). In diesem Fall werden die sich wiederholenden Einheiten der O-Antigen-Region am gleichen C_{55}-isoprenylphosphat polymerisiert, das auch für die Murein-Biosynthese verwendet wird.

Für die Möglichkeit, daß die Polymerisation bereits in der Cytoplasmamembran beginnt, spricht auch, daß eine Endopeptidase gefunden worden ist, die in quervernetzten Muropeptiden zwischen Dap und D-Alanin spaltet und ausschließlich in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (20,23). Obwohl das Enzym in vitro die entgegengesetzte Reaktion, nämlich die Transpeptidierung nicht katalysiert, könnte möglicherweise in vivo eine solche Reaktion stattfinden und damit die Quervernetzung in der Cytoplasmamembran erfolgen.

Auch die Art des Einbaus des Lipoproteins in den Murein-Lipoprotein Komplex ist noch nicht geklärt worden. Um diese Probleme anzugehen, werden E.coli W7-Zellen für 45 Sek. mit ^{3}H-Dap pulsmarkiert und die innere und äußere Membran anhand der Osborn-Methode getrennt (34). Der Hauptteil der gesamten Radioaktivität in der Zellhülle findet sich als Murein-Vorstufen in der Cytoplasmamembran, der Rest in der äußeren Membran. Letzteres repräsentiert entweder fertiges Murein oder ebenfalls Vorstufen. Die Radioaktivitätsverteilung innerhalb der Membrane ist in Abb. 9 gezeigt.

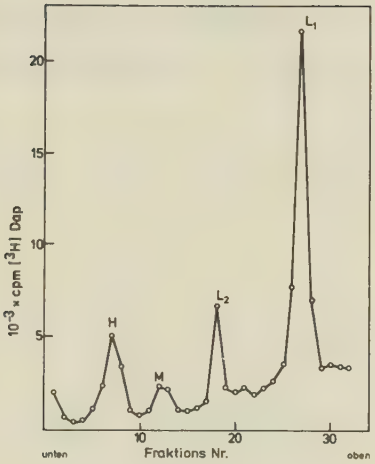


Abb. 9 Trennung von Membranen durch Sucrose-Dichtezentrifugation nach 45 Sek.-Pulsmarkierung mit ^{3}H-Dap (Osborn-Methode).

Gipfel H ist die äußere Membran, M ist ungetrennte Zellhülle, und L_1 und L_2 sind Fraktionen der Cytoplasmamembran. Der Unterschied zwischen L_1 und L_2 ist unbekannt; es wird allerdings vermutet, L_2 könnte in größerem Ausmaß mit äußerer Membran kontaminiert sein (34).

Da E.coli W7 benutzt wurde, liegt die gesamte Radioaktivität in der Form von eingebautem ^{3}H-Dap vor. Durch Identifizierung der in vivo gebildeten Produkte ist es möglich, einen Einblick in die letzten Schritte der Murein-Biosynthese zu erhalten.

Eine solche Identifizierung erreicht man hauptsächlich durch absteigende Papierchromatographie der Membransuspension in den Systemen Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5:3) oder Äthanol: 1 M Ammoniumacetat (7.5:3).

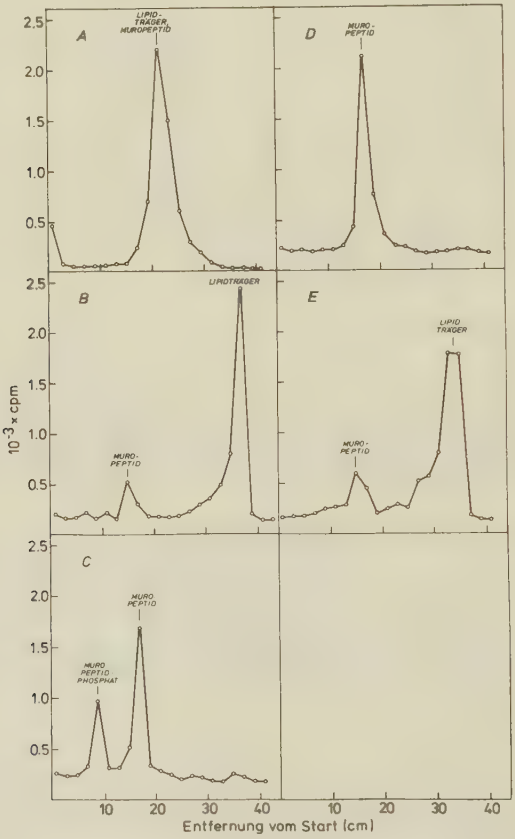


Abb. 10 Papierchromatographie der Cytoplasmamembran (mit der Osborn-Methode abgetrennt) von ^{3}H-Dap-pulsmarkierten Zellen.

Abb. 10a zeigt eine Chromatographie der Cytoplasmamembran in dem System Äthanol: 1 M Ammoniumacetat (7.5:3). Abb. 10b,c,d, e zeigen alle Chromatographien in dem System Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5:3). 10b ist ohne weitere Behandlung, 10c ist nach Hydrolyse in 0.1M HCl, 105°C, 20 Min. und 10e ist nach Pronase-Spaltung.

Betrachtet man zuerst die Cytoplasmamembran, sieht man, daß in beiden Systemen der größte Teil der Radioaktivität (90%) in die Position der an Lipid-Träger gebundenen Muropeptide läuft (Abb. 10a,b). Es ist bekannt, daß die Bindung zwischen dem Lipid-Träger und der Murein-Vorstufe gegen schwache Säurehydrolyse sensitiv ist (2). Dadurch kann die Vorstufe vom Träger abgelöst und identifiziert werden. Ursprünglich wurde die Hydrolyse in 10% Essigsäure für 30 Min. bei 105°C durchgeführt, was zu dem totalen Verschwinden der Radioaktivität vom Lipid-Träger-Gipfel führt. Dafür erhält man 2 Peaks, in der Position von einzelnen Muropeptiden und von Muropeptid-Dimeren (Abb. 10c). Dieses ursprüngliche Ergebnis deutet die Existenz von Muropeptid-Dimeren in der Cytoplasmamembran an, die an Lipid-Träger gebunden sind, d.h. es stellt einen Hinweis dar, daß in der Cytoplasmamembran Transpeptidierung stattfindet. Jedoch haben längere Inkubationszeiten zur Folge, daß der Gipfel in der Position von Muropeptid-Dimeren abnimmt. Hydrolyse in 10% Essigsäure für 60 Min. bei 105°C oder in 0.1 M HCl für 20 Min. bei 105°C resultiert in der Bildung von nur einzelnen Muropeptiden (Abb. 10d). Die quervernetzende Peptid-Bindung eines Muropeptid-Dimers wird unter diesen Bedin-

gungen nicht hydrolysiert. Die Schlußfolgerung ist, daß der langsam-laufende Gipfel wahrscheinlich ein nicht quervernetztes Muropeptidphosphat darstellt, das aufgrund von unvollständiger Hydrolyse der Pyrophosphat-Bindung gebildet wird. Pronase-Spaltung der Cytoplasmamembran verändert nicht das Chromatographie-Verhalten der Radioaktivität - nur ein einziger Gipfel an der Position des Lipid-Trägers wird erhalten (Abb. 10e).

Einen weiteren Nachweis dafür, daß der schnell laufende Gipfel ein einzelnes Muropeptid darstellt, das am C_1-Atom seiner Muraminsäure an den C_{55}-isoprenylphosphat-Träger gebunden ist, erhält man nach Alkali-Behandlung der pulsmarkierten Cytoplasmamembran.

Nur wenn das C_1-Atom von Muraminsäure frei ist, d.h. nur nachdem der Lipid-Träger durch schwache Säurehydrolyse entfernt worden ist, führt Alkali-Behandlung zur Freisetzung des Pentapeptids (siehe Abb. 11).

Diese Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von nur einem einzigen Produkt in der Cytoplasmamembran hin - an Lipid-Träger gebundene Murein-Untereinheiten. Es gibt zusätzlich eine geringe Kontamination durch Muropeptide, aber keinen Hinweis für Lipoprotein-gebundene Radioaktivität oder irgendein anderes Zwischenprodukt. Elektrophorese in 15%igen Polyacrylamid-Gelen konnte diese Schlußfolgerung bestätigen. Die "Puls"-Cytoplasmamembran ergibt einen einzelnen Gipfel, der schneller läuft als der zugesetzte Marker Cytochrom c (Abb. 12b). Lipoprotein ande-

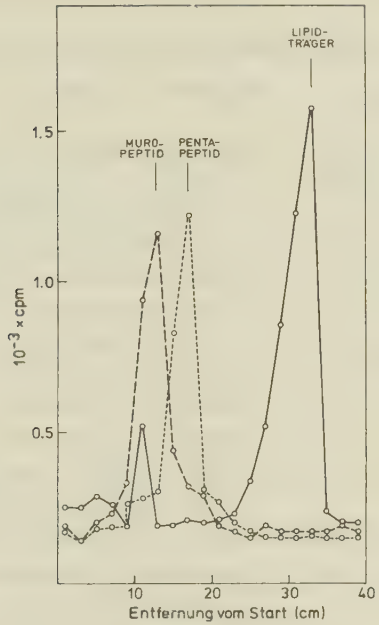


Abb. 11 Freisetzung der Pentapeptide durch Alkali-Behandlung

Die Methode ist in Abschnitt 2.6.4 beschrieben. Die geschlossene Linie stellt pulsmarkierte Cytoplasmamembran dar, entweder unbehandelt oder nach Inkubation in 4 M NH_3 für 6 h bei 37°C. Die gestrichelte Linie zeigt die Chromatographie nach schwacher Säurehydrolyse allein (siehe auch Abb. 10d), wogegen die gepunktete Linie das Chromatographieverhalten zeigt, wenn nach der schwachen Säurehydrolyse eine Alkali-Behandlung folgt (6 h Inkubation in 4 M NH_3 bei 37°C).

rerseits läuft langsamer als Cytochrom C. Der Gipfel kann durch Behandlung mit, schwacher Säure, aber nicht mit Pronase in die Position von Muropeptiden verschoben werden (nicht gezeigt).

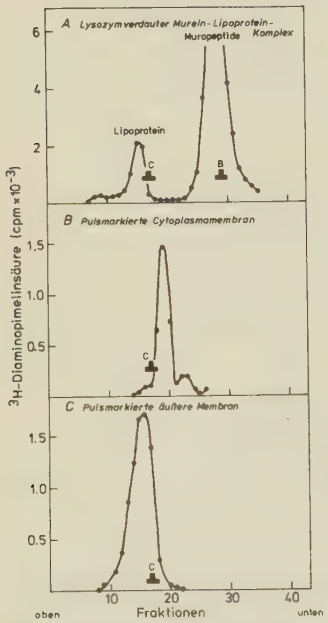


Abb. 12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Membranen.

A) ^{3}H-Dap-markiertes Murein-Lipoprotein nach Lysozym-Spaltung; B) Cytoplasmamembran und C) äußere Membran nach 45 Sek.-Einbau von ^{3}H-Dap; Präparation nach Osborn. Die Proben werden in 1% SDS (Na-dodecyl-sulphat), 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, für 5 Min. bei 100°C erhitzt. Dann werden sie auf 15%ige Polyperylamid-Gele, die 0.01 M EDTA, 0.1% SDS, pH 7.9 enthalten, aufgetragen. Der gleiche Puffer wird in die Elektroden-Kammern gefüllt. Die Elektrophorese läuft bei konstanter Stromstärke von 3mA/Gel ab, bis der Farbstoff Bromphenol Blau 1 cm vom Gelende angelangt ist. Ansonsten folgt die Methode der von Weber und Osborn (48). Die Gele werden in 35 gleiche Stücke geschnitten, über Nacht bei 60°C mit 0.5 ml 0.1% SDS in Zählgläschen extrahiert und nach Zugabe von 10 ml Aquasol gezählt. Die Positionen des zugesetzten Cytochrom C und des Bromphenolblau sind als C bzw. B markiert.

Um nun zur äußeren Membran von E.coli W7 zu kommen, sind in Abb. 13 die Ergebnisse der Papierchromatographie nach einem Puls mit ^{3}H-Dap dargestellt. Bei Chromatographie im System Äthanol: 1 M Ammoniumacetat (7.5:3) bleibt alle Radioaktivität am Start, wie es

von Lipoprotein-gebundener Radioaktivität zu erwarten ist; Muropeptide und Lipid-Träger-gebundene Muropeptide sind nicht feststellbar (Abb. 13a; vgl. Abb. 10a). Im System Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5 : 3) erhält man mehrere Gipfel, die Radioaktivität läuft bis zur Position des Lipoproteins (Abb. 13b). Pronase-Spaltung verursacht eine Verschiebung der Raioaktivität und ergibt ein langsamer laufendes heterogenes Produkt-Gemisch (Abb. 13c), schwache Säurehydrolyse hat jedoch wenig Effekt (nicht gezeigt). Es wird daraus geschlossen, daß die in Abb. 13b sichtbaren Produkte Lipoprotein-gebundene Muropeptide repräsentieren, die von der Lysozym-Spaltung des Murein-Lipoprotein-Komplexes abstammen. Die Heterogenität (sowohl ohne als auch mit vorangegangener Pronase-Spaltung) rührt daher, daß die Lysozym-Spaltung (bei $0^{\circ}C$) nicht vollständig war, weshalb unterschiedlich viele Murein-Untereinheiten an das Lipoprotein gebunden bleiben.

Daß in der äußeren Membran tatsächlich nur Lipoprotein-gebundene Muropeptide vorhanden sind, konnte wiederum durch Gelelektrophorese bestätigt werden (Abb. 12c).

Ein einziger Radioaktivitäts-Gipfel in der Position von Lipoprotein, d.h. etwas langsamer laufend als Cytochrom C, wird erhalten. Dieser Gipfel kann zur Position von Muropeptiden verschoben werden durch Pronase-Spaltung, aber nicht durch schwache Säurehydrolyse.

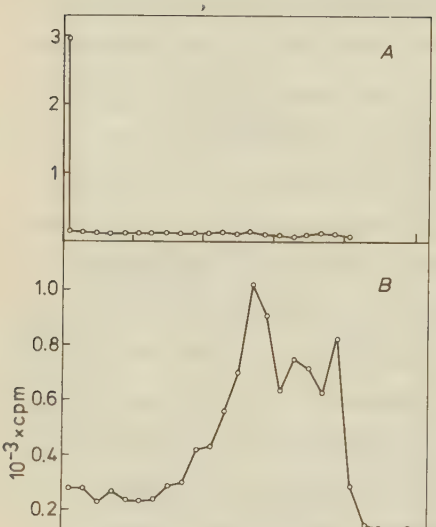


Abb. 13 Papierchromatographie der Äußeren Membran (abgetrennt mit der Osborn-Methode) von ^{3}H-Dap-pulsmarkierten Zellen.

Abb. 13a zeigt eine Chromatographie der äußeren Membran in dem System Äthanol: 1 M Ammoniumacetat (7.5:3). Abb. 13b, c: System Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5 : 3); in b ohne weitere Behandlung, in c nach Pronase-Spaltung.

Die Lipid-Träger-gebundenen Untereinheiten des Mureins in der Cytoplasmamembran und die Lipoprotein-gebundenen Muropeptide in der äußeren Membran sind die einzigen Produkte, die man nach Pulsmarkierung der E.coli-Zellen mit ^{3}H-Dap in den Zellhüllen findet. Damit ist in vivo bestätigt, daß die Murein-Untereinheiten, an das C_{55}-isoprenylphosphat gebunden, durch die Cytoplasmamembran transportiert werden. Letzteres dringt nicht selbst in die äußere Membran ein und es wird auch kein weiterer Träger gefunden. Eine Muropeptid-Lipoprotein-Vorstufe ist in der Cytoplasmamembran nicht feststellbar. Diese Experimente können jedoch keinen Aufschluß darüber geben, ob die Muropeptid-

Lipoprotein-Produkte in der äußeren Membran möglicherweise von Vorstufen oder von fertig synthetisiertem Murein-Lipoprotein-Komplex abstammen.

3.4.4 Membran-gebundene Vorstufen des Murein-Lipoprotein-Komplexes. Trypsin-Methode.

Die Anwendung von Lysozym für die Membran-Trennung ist alles andere als ideal für die Untersuchung der Murein-Biosynthese. Dies nicht nur, weil das Murein selbst abgebaut wird, sondern es ist möglich, daß bereits polymerisierte Vorstufen existieren, die ebenfalls durch Lysozym gespalten werden. Nun konnte jedoch durch Ausnutzung des spezifischen Effekts von Trypsin auf Zellhüllen von E.coli (7) eine neue Methode für die Trennung von innerer und äußerer Membran entwickelt werden. Abb. 14 zeigt eine solche Trennung der Membranen von E.coli W7-2 Zellen nach einem 45 Sek.-Puls mit ^{3}H-Dap.

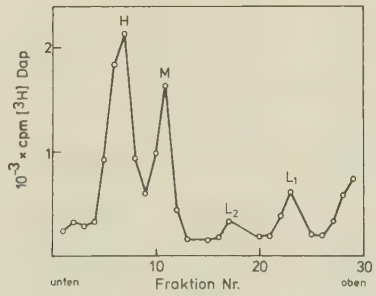


Abb. 14 Trennung von Membranen durch Succrose-Dichte-Zentrifugation nach 45 Sek.-Pulsmarkierung mit ^{3}H-Dap (Trypsin-Methode)

(Abb.14) Die Membrane werden mit der Trypsin-Methode präpariert (20); die weitere Trennung, die Messung und das Sammeln der Gipfel sind in Material und Methoden beschrieben.

Im allgemeinen ist die Membran-Trennung nicht so gut wie mit der Osborn-Methode. Die M-Bande, die ungetrenntes Membranmaterial darstellt, ist oft groß und macht bis zu 50% der Gesamt-Radioaktivität aus. Trotzdem kann man reine Cytoplasma- und äußere Membran sammeln und die radioaktiven Produkte identifizieren. Nach Pulsmarkierung für 45 Sek. sind nur etwa 10 - 15 % der Gesamt-Radioaktivität in der Cytoplasmamembran lokalisiert, da bei der Trypsin-Methode das Murein intakt bleibt. Dadurch ergibt sich der Unterschied zur Osborn-Methode (70% in der Cytoplasmamembran), bei der aufgrund der Lysozym-Spaltung des Mureins, nur die Lipoprotein-gebundenen Muropeptide in der äusseren Membran verbleiben.

Papierchromatographie dieser pulsmarkierten Cytoplasmamembran zeigt zwei Komponenten - eine Komponente verbleibt am Start, die andere läuft in die Position des Lipid-Trägers. In dem gezeigten Beispiel (Abb. 15) verursacht eine Behandlung der Cytoplasmamembran mit Lysozym ein Anwachsen der relativen Menge an Lipid-gebundener Radioaktivität (vgl. die Gesamt-Radioaktivität auf dem Chromatogramm) von 50 auf 62% und die restlichen 38% laufen nun in die Position von Muropeptiden (Abb. 15b). Schwache Säurehydrolyse löst die Radioaktivität vom Lipid und verschiebt sie in die Position der Muropeptide (Abb. 15c).

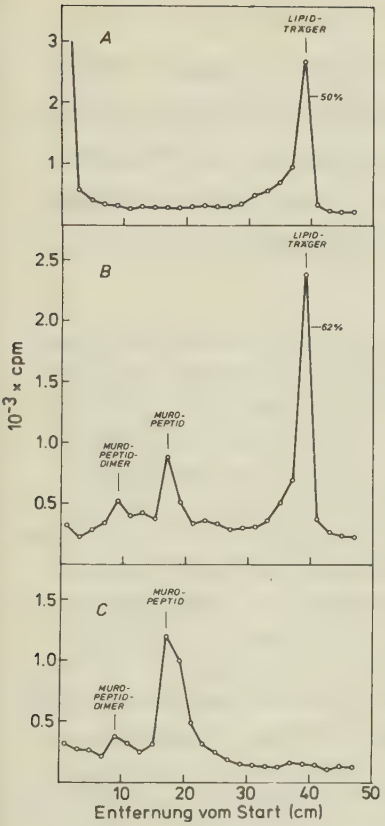


Abb. 15 Papierchromatographie von pulsmarkierter Cytoplasmamembran, präpariert mit der Trypsin-Methode.

Das benutzte System ist Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5:3). Abb. 15a: Cytoplasmamembran ohne weitere Behandlung; Abb. 15b: nach Lysozym-Spaltung und Abb. 15c: nach Lysozym-Spaltung und anschließender schwacher Säurehydrolyse.

Diese Ergebnisse gaben Anlaß zu der Arbeits-Hypothese, daß die am Start verbleibende Radioaktivität polymerisierte, an Lipid-Träger gebundene Muropeptide darstellt. Diese Hypothese kann jedoch schnell verworfen werden, wenn die beiden ^3H-Dap-markierten Komponenten in der Cytoplasmamembran voneinander getrennt untersucht werden. Der schnell-chromatographierende Gipfel kann von der Radioaktivität am Start durch Papierchromatographie der Cytoplasmamembran getrennt werden. Das Material am Start wird einer Lysozym-Spaltung unterworfen, indem der Startpunkt nach vollständigem Trocknen des Papiers mit einer 0.2%igen Lysozym-Lösung getränkt wird. Von Zeit zu Zeit wird Wasser zugegeben, um den Startpunkt feucht zu halten und es wird bei Raumtemperatur für 1.5 Std. inkubiert. Die so gebildeten Produkte werden dann in

der zweiten Richtung chromatographiert (Abb. 16b).

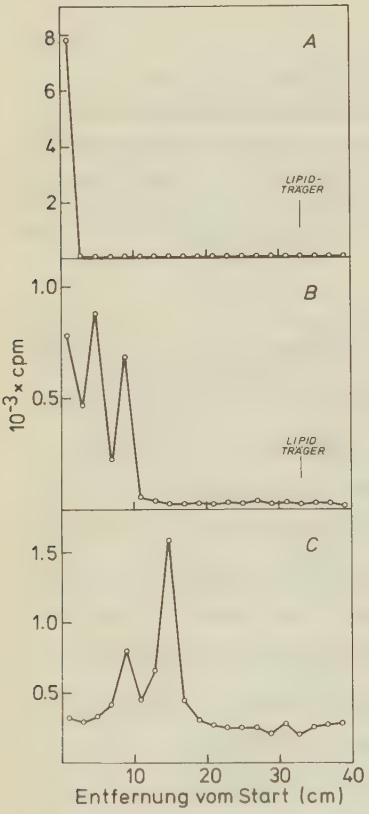


Abb. 16 Charakterisierung der nach Papierchromatographie von pulsmarkierter Cytoplasmamembran am Startpunkt verbleibender radioaktiver Komponente (Membrantrennung mit der Trypsin-Methode).

Die Lipid-Träger-gebundene Radioaktivität wurde durch Papierchromatographie oder durch Extraktion mit Butan-1-ol: 6 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1) entfernt. Nur die am Start verbleibende Radioaktivität (Abb. 16a) wird mit Lysozym gespalten. Wenn der Lipid-Träger durch Papierchromatographie entfernt worden ist, wird die Lysozym-Spaltung auf dem Papier durchgeführt. Die Produkte werden dann in der zweiten Dimension chromatographiert (Abb. 16b). Wenn jedoch der Lipid-Träger durch Extraktion entfernt worden ist, erfolgt die Lysozym-Spaltung des polymerisierten Materials in Lösung. Nach Chromatographie der Produkte erhält man Abb. 16c. In allen Fällen ist das Laufmittel-System Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5 : 3).

Obwohl die Lysozym-Spaltung nicht vollständig gewirkt hat, ist zu ersehen, daß nur radioaktive Muropeptide, aber keine Lipid- oder Lipoprotein-gebundene Radioaktivität aus dem Material am

Startpunkt gebildet worden ist. Dies zeigt an, daß diese Komponente Murein darstellt (möglicherweise Kontamination von der äußeren Membran), wovon das Lipoprotein durch die Trypsin-Spaltung entfernt worden ist. Damit ist ausgeschlossen, daß das polymerisierte Material an Lipid-Träger gebunden ist.

Der schnell laufende Gipfel (Lipid-Träger-gebundene Radioaktivität) kann ferner vollständig und spezifisch entfernt werden durch Extraktion der Cytoplasmamembran mit Butan-1-ol: 6 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1). Die Komponente, die bei Papierchromatographie nicht läuft, verbleibt bei der Extraktion in der Wasserphase. Sie kann abzentrifugiert und mit Lysozym gespalten werden. Wiederum erhält man nur einzelne Muropeptide und Murein-Dimere, in diesem Fall jedoch war die Lysozym-Spaltung vollständig und überhaupt keine Radioaktivität verbleibt mehr am Startpunkt (Abb. 16c). Die schnell laufende Komponente kann ebenfalls in isolierter Form untersucht werden. Die Isolierung erreicht man zum einen durch Spaltung der mit der Trypsin-Methode präparierten Membran mit Lysozym und anschließender Zentrifugation bei 140,000g für 2 Std. Nur die schnell laufende Komponente bleibt im Sediment, da das polymerisierte Material zu löslichen Muropeptiden gespalten wurde, die in den Überstand gehen. Zum anderen kann man diese Komponente aus der organischen Phase nach Extraktion der Membran mit Butan-1-ol: 6 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1) isolieren. Die organische Phase wird am Vakuum zur Trockne gebracht und in Wasser aufgenommen. In beiden Fällen verschiebt schwache Säurehydrolyse die Radioaktivität in die Position von einzelnen Muropeptiden, wogegen Pronase keinen Effekt hat (vgl. Abb. 10).

Diese getrennte Untersuchung der beiden ^{3}H-Dap-markierten Komponenten in der Cytoplasmamembran, nach Trypsin-Präparation von ^{3}H-Dap-pulsmarkierten Zellen hat gezeigt, daß die schnell laufende Komponente einzelne Muropeptid-Vorstufen, an Lipid-Träger gebunden, darstellt und die Komponente am Start Murein repräsentiert. Letztere kann auf Kontamination von der äußeren Membran zurückgeführt werden. Es erhebt sich nun die Frage, warum die Ergebnisse nach Lysozym-Spaltung der gesamten Cytoplasmamembran so irreführend waren (siehe Abb. 15). In Abb. 16 kann man sehen, daß 7800 cpm nach Papierchromatographie in der 1. Dimension am Startpunkt verbleiben, nur 2640 cpm werden aber nach Lysozym-Spaltung wiedergefunden. Es stellt sich heraus, daß, wie auch von Anderen gezeigt wurde (47), eine im Chromatographie-Laufmittel lösliche Radioaktivität in die Papierfasern eindringen kann, wodurch sie 2-3mal mehr gequencht wird als unlösliches Material. So ergeben sich z.B. nach Lysozym-Spaltung des polymerisierten Materials am Start ohne weitere Chromatographie nur 30-50 % gemessene cpm im Vergleich zu einer nicht gespaltenen Probe. Es ist dieser Effekt auf die Radioaktivitäts-Messung, der zu den irregührenden Ergebnissen von Abb. 15 geführt hat.

Papierchromatographie der äußeren Membran ergibt nur eine Komponente, die am Start verbleibt. Auch verbleibt diese Komponente nach Extraktion mit Butan-1-ol: 6 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1) in der Wasser-Phase und zeigt nach Lysozym-Spaltung nur quervernetzte und nicht quervernetzte Muropeptide. Es ist fertigsynthetisiertes Murein, von dem das Lipoprotein durch Trypsin

abgespalten worden ist.

3.5 Lipoprotein, an neusynthetisiertes Murein gebunden. Die Existenz einer SDS-löslichen, polymerisierten Murein-Vorstufe.

Bisher sind die Produkte, die man in den Membranen nach einem kurzen Puls mit ^{3}H-Dap markiert hat, nur im Anschluß an eine Lysozym- oder Trypsin-Spaltung untersucht worden.

Im Folgenden werden Zellhüllen präpariert durch Öffnen der Zellen mit Ultraschall, durch Abzentrifugieren und Waschen der Zellhüllen im Sediment. Die Produkte in den Zellhüllen von E.coli W7 nach Pulsmarkierung mit ^{3}H-Dap und "Chase" für verschiedene Zeiten werden durch Papierchromatographie im System Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5:3) untersucht. Die Ergebnisse eines solchen Experiments sind in Tabelle 3 dargestellt.

Probe	% cpm am Start	% cpm gebunden an Lipidträger
45 Sek. Puls	76	24
30 Sek. Chase	94.5	5.5
2 Min. Chase	98	2
7 Min. Chase	98.6	1.4

Tabelle 3. Übertragung ^{3}H-Dap-markierter Produkte vom Lipidträger auf polymerisiertes Material.

Man findet nur zwei Produkte bei Papierchromatographie von ^{3}H-Dap-markierten Zellhüllen - das eine bleibt am Start zurück, das andere läuft in die Position von an Lipidträger gebundenen Muropeptiden. Nach einem 45 Sek.-Puls ist der Anteil der Radioaktivität im schnell laufenden Gipfel ziemlich hoch (24%). Bereits ein 30 Sek.-"Chase" mit nichtradioaktivem Dap jedoch zeigt den raschen Transfer dieser Radioaktivität auf das Produkt am Start an. Bei einem längeren "Chase" geht der Radioaktivitäts-Anteil im schnell laufenden Gipfel weiter zurück. Aus Gründen, die auf Seite 62 dargelegt wurden, ist dabei zu bemerken, daß der Startpunkt auf dem Chromatogramm vor der Radioaktivitäts-Messung einer Lysozym-Behandlung unterzogen wird.

Die schnell laufende Komponente kann aus den Zellhüllen entfernt werden durch Extraktion mit Butan-1-ol: 6 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1). Sie repräsentiert Lipidträger-gebundene Murein-Vorstufen. Die Wasserphase, die bei dieser Extraktion anfällt, enthält die bei der Papierchromatographie am Start verbleibende Komponente. Spaltet man sie mit Lysozym, so erhält man bei anschließender Untersuchung drei Produkte - Muropeptid-Dimere, einzelne Muropeptide und Lipoprotein-gebundene Muropeptide (in pulsmarkierten Zellhüllen macht letzteres 10-15 % aus). Dies sind Produkte, wie sie nach Lysozym-Spaltung des Murein-Lipoprotein-Komplexes zu erwarten sind. Läßt man auf die Lysozym-Spaltung eine Pronase-Spaltung folgen, so wird hierdurch die Radioaktivität vom Lipoprotein freigesetzt und zur Position der Muropeptide verschoben. Hier ist nun ein Unterschied festzustel-

len in der Menge an Lipoprotein, das an markiertes Murein gebunden ist: bei Zellhüllen, die für 45 Sek. bis 5 Min. pulsmarkiert sind, sind 10-15% der Radioaktivität Lipoprotein-gebunden, bei Zellhüllen, die für 2 Generationen durchmarkiert sind, sind ungefähr 30% der Radioaktivität an Lipoprotein gebunden. Dies bedeutet, daß neusynthetisiertes Murein weniger gebundenes Lipoprotein enthält; tatsächlich sind ziemlich lange Einbau-Zeiten nötig (ca. 30 - 60 Min.), um die "Gleichgewichts-Menge" an Lipoprotein zu erhalten.

Tabelle 4. Menge an Lipoprotein in polymerisierten Produkten

Herkunft des polymerisierten Produkts	% gebundenes Lipoprotein
Zellhüllen, nach einem 2 Min.-Puls	10 - 15
Zellhüllen, für 2 Generationen markiert	30
Sacculi, nach einem 2 Min.-Puls	2 - 5
Sacculi, für 2 Generationen markiert	30
SDS-Überstand/ Aceton - Präzipitat nach einem 5 Min.-Puls	28

Im Falle von Zellhüllen wird das polymerisierte Material zuerst von der Lipid-Träger-gebundenen Radioaktivität abgetrennt durch Extraktion mit Butan-1-ol: 4 M Pyridinacetat pH 4.2 (2:1). Die unlöslichen Sacculi werden zweimal mit Wasser gewaschen, um das SDS zu entfernen. Der SDS-Überstand/ Aceton Präzipitat wird zweimal mit Aceton gewaschen, um das SDS zu entfernen, lysophilisiert, um

Aceton zu entfernen und schließlich in Wasser aufgenommen. Alle Proben werden über Nacht mit Lysozym gespalten und dann der Papierchromatographie im System Isobuttersäure: 1 M NH_4OH (5:3) unterzogen. In der Tabelle ist der Anteil an der gesamten Radioaktivität, der in die Position von Lipoprotein läuft, dargestellt.

Ein weiterer, sogar noch bemerkenswerterer Unterschied im Anteil an Lipoprotein läßt sich feststellen, wenn der Murein-Lipoprotein-Komplex (der Sacculus) isoliert wird durch Lösen ^{3}H-Dap-pulsmarkierter Zellen oder Zellhüllen in kochendem 4%igen SDS. Nach Lysozym-Spaltung dieser Sacculi erhält man Muropeptide (sowohl einzelne als auch Dimere), aber sehr wenig markiertes Lipoprotein (2-5%). Hier besteht also eine Diskrepanz zwischen den Mengen der an Lipoprotein gebundenen Radioaktivität in pulsmarkierten Zellhüllen und nach Isolierung der SDS-unlöslichen Sacculi. Es erhebt sich sofort die Frage, ob ein Produkt existiert, das zwar bereits polymerisiert, aber noch SDS-löslich ist und einen höheren Anteil an gebundenem Lipoprotein enthält. Tatsächlich findet man ein solches SDS-lösliches Polymer, wenn man den SDS-Überstand (nach Entfernen der Sacculi durch Zentrifugation) mit einem fünffachen Überschuß an Aceton präzipitiert. Nach einem 5 Min.-Puls findet man ca. 30% der gesamten in der Zellhülle vorhandenen Radioaktivität in diesem SDS-löslichen Material. Nach Lysozym-Behandlung des SDS-löslichen radioaktiven Materials repräsentiert der Lipoprotein-Gipfel 28% der gesamten Radioaktivität, d.h., SDS-lösliche und SDS-unlösliche Produkte zusammengenommen erhält man ungefähr den Lipoprotein-

Anteil der ganzen Zellhülle (siehe Tabelle 4).

Es kann gezeigt werden, daß dieses SDS-lösliche Material eine echte Vorstufe darstellt und nicht einfach einen Teil des normalen Murein-Lipoprotein-Komplexes enthält, der nicht abzentrifugiert worden ist. Bei längeren Markierungszeiten (90 Min.) nimmt die Radioaktivität im SDS-Überstand nur mit der Wachstumsrate der Zellen zu, wogegen die Einbaurate in SDS-unlösliches Murein sehr viel schneller ist.

Erste Experimente, diese SDS-lösliche Vorstufe zu isolieren, sind durchgeführt worden. Auf einer Biogel A 0.5-Säule, auf der Murein-Sacculi ausgeschlossen werden, erhält man einen Gipfel, der schneller eluiert als die Lipidträger-gebundenen Vorstufen. Offensichtlich repräsentiert dieser Gipfel die SDS-lösliche, polymerisierte Murein-Vorstufe. Diese sollte noch weiter charakterisiert werden. Diese Experimente mit pulsmarkierten Zellhüllen deuten darauf hin, daß das erste Produkt nach der Lipidträger-gebundenen Murein-Vorstufe ein SDS-lösliches Murein-Polymer ist. Dieses enthält fast alles Lipoprotein, das an neugemachtes Murein gebunden ist. Das nächste Produkt ist SDS-unlöslich, enthält aber zunächst praktisch kein Lipoprotein gebunden. Es hat den Anschein, daß das Endprodukt mit gebundenem Lipoprotein erst nach relativ langer Zeit gebildet wird.

3.6 Diskussion der in vivo-Untersuchungen über die Biosynthese des Murein-Lipoprotein-Komplexes.

In den Abschnitten 3.4 und 3.5 sind die in vivo Untersuchungen über die letzten Schritte der Biosynthese des Murein-Lipo-

protein-Komplexes beschrieben. Dabei wurden Zellen mit ^{3}H-Dap pulsmarkiert und die markierten Produkte identifiziert, wobei Zellhüllen und Membrane mit verschiedenen Methoden präpariert wurden. Es stellt sich heraus, daß Lipidträger-gebundene Muropeptide als erstes Produkt in der Zellhülle auftreten. Durch "Chase" mit nichtradioaktivem Dap zeigt sich der direkte Transfer der Radioaktivität vom Lipidträger auf polymerisiertes Material (Abschnitt 3.5). Es ist kein nicht-polymerisierter Zwischenträger zu finden. In Membranen, die mit der Osborn-Methode aufgetrennt worden sind (Abschnitt 3.4.3) läßt sich zeigen, daß die C_{55}-isoprenylphosphat-gebundene Radioaktivität ausschließlich in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Der Lipidträger dringt nicht in die äußere Membran ein, das bedeutet, die gebundenen Muropeptide müssen vom Lipidträger direkt auf einen Akzeptor in der äußeren Membran übertragen werden.

Um zu diesem Akzeptor in der äußeren Membran zu kommen, der vom Lipidträger in der Cytoplasmamembran Muropeptide aufnimmt: zwei verschiedene Untersuchungsmethoden wurden angewandt, um seine Natur aufklären zu können.

Zunächst kann in Membranen, die mit der Trypsin-Methode aufgetrennt wurden (Abschnitt 3.4.4) und mit ^{3}H-Dap pulsmarkiert wurden, gezeigt werden, daß polymerisiertes Material Murein-Produkte repräsentieren (es ergibt sich nach Lysozym-Spaltung ein normales Muster von quervernetzten und nicht quervernetzten Muropeptiden). Dieses Murein enthält kein Lipoprotein, da dieses durch die Trypsin-Spaltung entfernt worden ist. Der größte Teil

dieses polymerisierten Materials ist in der äußeren Membran lokalisiert (90-35%), ein kleiner Teil jedoch in der Cytoplasmamembran und dürfte auf Kontamination von der äußeren Membran zurückzuführen sein. Wichtig ist der Befund, daß das polymerisierte Material nicht an den Lipidträger gebunden ist. Dies steht im Gegensatz zu der Situation in B. licheniformis, wo gezeigt worden ist, daß die Polymerisierung am C_{55}-isoprenylphosphat stattfindet (47). Wie im Abschnitt 3.5 dargelegt wurde, konnte dieses Material weiter fraktioniert werden in eine SDS-lösliche polymerisierte Vorstufe und in ein SDS-unlösliches Produkt. Diese ist jedoch noch nicht das Endprodukt, da es sehr wenig gebundenes Lipoprotein enthält (ca. 5% gegenüber ca. 30% nach Durchmarkierung). Das SDS-lösliche Polymer dagegen, das in pulsmarkierten Zellhüllen etwa 30% des gesamten polymerisierten Materials ausmacht, enthält eine große Menge gebundenes Lipoprotein. Man ist versucht anzunehmen, daß diese Vorstufe, durch das gebundene Lipoprotein in der äußeren Membran gelöst, beweglich ist und durch die Membran auf geeignete Einbaustellen am Murein-Sacculus transportiert werden kann. Man muß dann weiter annehmen, daß die Lipoprotein-Moleküle beim Einbau in das SDS-unlösliche Netzwerk des Mureins vom SDS-löslichen Polymer abgespalten werden. Daher ist das nächste Produkt SDS-unlöslich, enthält aber sehr wenig gebundenes Lipoprotein. Später jedoch (nach ungefähr einer Generation) ist der Anteil an gebundenem Lipoprotein wieder normal, was bedeutet, daß die Lipoprotein-Moleküle an "altes" Murein wieder gebunden werden. Diese hypothetische Anlagerung - Abspaltung - erneute Anlagerung von Lipo-

protein wird zu einem gewissen Grad durch die Befunde von Inouye (26) unterstützt, der zeigte,daß gegenüber der gebundenen Form doppelt soviel Lipoprotein in nichtgebundener Form existiert. Offensichtlich herrscht zwischen den beiden Formen ein dynamisches Gleichgewicht vor.

3.7. Immunologische Experimente

Die bekannten, bis hierher beschriebenen Daten über das Lipoprotein werfen weitere interessante Fragen auf. Eine solche Frage betrifft das Vorkommen des Lipoproteins in zu E.coli verwandten Spezies. Die sehr bemerkenswerte, repetitive Aminosäure-Sequenz des Lipoproteins (5) kann einerseits auf einen hohen evolutionären Selektionsdruck hindeuten, der Aminosäure-Austausche verhindert. Oder aber, weil das Lipoprotein wahrscheinlich eine strukturelle Rolle spielt, ist eine merkliche Anpassung des Moleküls an die Umgebung nicht notwendig, um seine Funktion zu erfüllen. Was immer der Grund sein mag, man könnte sich vorstellen, daß das Lipoprotein auch noch vorhanden ist, nachdem andere Veränderungen die Zell-Vorfahren in verschiedene Spezies aufgeteilt haben. Es fällt auch nicht schwer, die Existenz von Lipoprotein-ähnlichen Strukturen in Spezies zu erwarten, die nicht mehr eng mit E.coli verwandt sind. Die Stämme Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Proteus mirabilis und Pseudomonas fluorescens sind bereits auf ein Murein-gebundenes Lipoprotein untersucht worden (8). Die beiden erstgenannten Spezies zeigten positive, die letzteren negative Ergebnisse. Es wäre jedoch möglich, daß in den letztgenannten Spezies das

Lipoprotein nur in ungebundener Form vorliegt (26); in der oben zitierten Untersuchung würde dies nicht entdeckt worden sein.

Andere interessante Fragen betreffen frühere Schritte in der Biosynthese des Lipoproteins. So ist z.B. vermutet worden, daß in der Biosynthese der Zellhüllen-Proteine eine besondere Klasse von Ribosomen beteiligt ist. Diese Vermutung beruht auf den unterschiedlichen Effekten von Antibiotika auf die Synthesen der cytoplasmatischen - und der Membranproteine (24,25). Da nun das Lipoprotein bis zu 30% der Zellhülle ausmacht und seine Struktur im Detail aufgeklärt worden ist, sollte es möglich sein, dieses Problem direkter anzugehen. Ein anderer Aspekt ist der Ort der Anlagerung des Lipid-Teils an das N-terminale Ende der Polypeptidkette. Der Befund, daß das Lipid wahrscheinlich aus dem Phospholipid-Stoffwechsel stammt (22), deutet auf seine Übertragung auf das Polypeptid in der Cytoplasmamembran hin. Dies ist jedoch nicht gezeigt worden und es ist theoretisch möglich, daß der Transfer am Ribosom stattfindet, bevor die Polypeptidkette vollständig synthetisiert ist.

Um diese Frage zu beantworten, braucht man eine Methode, um Lipoprotein oder spezifische Teile davon in Fraktionen von Zellen, etwa an Ribosomen, feststellen zu können. Nun, da Lipoprotein in reiner Form verfügbar ist (und Antiseren dagegen produziert werden können), drängen sich immunologische Methoden von selbst auf. Immunologische Kreuzreaktion eines Antiserums gegen Lipoprotein mit geeignet präparierten Proben von anderen

Spezies wird die An- oder Abwesenheit von Lipoprotein-verwandten Strukturen in diesen Spezies anzeigen. Mit spezifischen Antiseren ist es ferner möglich, spezifische unvollendete Polypeptidketten an Ribosomen festzustellen (21), was eine Voraussetzung ist für den Versuch, Ribosomen in verschiedene Klassen aufzuteilen. Wenn man darüber hinaus Antiseren ausschließlich gegen die Lipid-Region als Antigen-Determinante produzieren könnte, wäre es auch noch möglich, zwischen Molekülen mit und ohne Lipid zu unterscheiden und so den Ort der Übertragung des Lipid-Teils auf die Polypeptidkette indirekt zu lokalisieren.

Schließlich könnten Antiseren gegen das Lipoprotein als einem Hauptprotein der Zellhülle theoretisch auch von klinischer Bedeutung sein, wie dies im Falle der Antiseren gegen Lipopolysaccharid gehofft worden war (29). Es wäre zu erwarten, daß Tiere gegen Infektionen mit gramnegativen Bakterien durch aktive oder passive Immunisierung gegen Lipoprotein geschützt werden könnten.

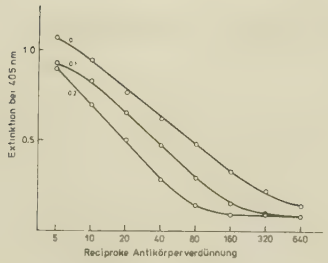
Um jedoch alle diese verschiedenen Probleme mit immunologischen Methoden angehen zu können, muß man sicher sein, daß die Antiseren spezifisch gegen das Lipoprotein gerichtet sind. Die Antiseren werden auf drei verschiedene Arten, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, präpariert: a) gegen reines Murein-Lipoprotein, präpariert durch Lysozym-Spaltung des Murein-Lipoprotein-Komplexes ("Lysozym-Lipoprotein") und auf homologe Kaninchen-Erythrozyten geschichtet; b) gegen reines zuckerfreies Lipoprotein, durch Trypsin-Spaltung des Murein-Lipoprotein-Komplexes

und auf homologe Kaninchen-Erythrozyten geschichtet und

c) gegen hitze-getötete E.coli B/r-Zellen, als solche injiziert.

3.8. Antiserum gegen "Lysozym-Lipoprotein"

Da reines Murein-Lipoprotein ("Lysozym-Lipoprotein") leicht durch Lysozym-Spaltung des M-MLP erhalten werden kann, wurde zuerst dagegen Antiserum präpariert. Der benutzte Test ist Immun-Hämolyse Inhibierung, wie sie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben wurde. Abbildung 17 a (links) zeigt die Kurve der Hämolyse und ihre Inhibierung durch Lipoprotein. An dieser Stelle muß bemerkt werden, daß trotz der offenbar völlig konstanten Bedingungen die Inhibierung zu Schwankungen neigt. Die Schwankung liegt normalerweise innerhalb der Fläche, die in Abbildung 17 b (rechts) angezeigt ist; dabei ist der Prozentanteil gebundener Antikörper gegen die Menge an eingesetztem Lipoprotein aufgetragen. Kontrollen einerseits mit Erythrozyten, die nicht mit Lipoprotein bedeckt sind, andererseits mit Serum, dem Antilipoprotein-Aktivität fehlt, geben keine (oder weniger als 10%) Hämolyse.



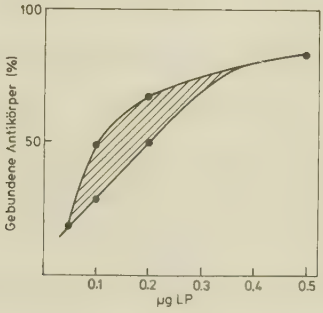


Abbildung 17: Immun-Hämolyse und seine Inhibierung durch Lipoprotein

a) (links): Der Immun-Hämolyse-Test wird wie in Abschnitt 2.7.5 durchgeführt. 1 µg Muropeptide und 1 µg Lysozym sind in diesem und in jedem folgenden Test mit diesem Antiserum gegenwärtig. Die obere Kurve zeigt die Hämolyse, die man ohne Zugabe von Inhibitor erhält. Die unteren Kurven zeigen das Ausmaß der Hämolyse, das man erhält, wenn man vor der Zugabe von Erythrozyten und Komplement 0.1 µg bzw. 0.2 µg Lipoprotein zu den Antiseren-Verdünnungsreihen zugibt. Die prozentuale Reduktion in der Fläche unter der Kurve ist proportional zum Prozentanteil gebundener Antikörper.

b) (rechts): Die Menge an Lipoprotein (µg) ist gegen den Prozentanteil gebundener Antikörper aufgetragen. Jedoch ergibt sich unter konstanten Bedingungen eine Schwankung im Anteil an gebundenem Antikörper bei gegebener Menge an Lipoprotein. Die dunklen Linien zeigen die an verschiedenen Tagen erzielten Ergebnisse an, die schraffierte Fläche das Ausmaß der Schwankung, das man normalerweise erwarten kann.

3.8.1 Erste Kontrollen-Muropeptide, Lysozym, Phospholipide, Lipopolysaccharide

Im Durchschnitt bleiben zwei Murein-Untereinheiten an jedes Lipoprotein-Molekül gebunden, wenn man Lipoprotein durch Lysozym-Spaltung präpariert. Da das Lipoprotein die Erythrozyten sehr wahrscheinlich durch Wechselwirkung seines N-terminalen

Lipid-Teils mit der Erythrozytenmembran bedeckt, ragen die Zukkerreste nach der Außenseite und können vielleicht vorzugsweise als Antigen-Determinanten wirksam werden. Dies wird getestet durch Zugabe reiner, salzfreier lyophilisierter Muropeptide zum Hämolyse-Ansatz. 1 µg Muropeptide bindet 20% der Antikörper, 10 µg inhibieren nicht stärker und 100 µg nur wenig stärker. Alkali-Behandlung, analog der Vorbehandlung des Lipoproteins und der Zellfraktionen durchgeführt, verstärkt nicht die Fähigkeit von reinen Muropeptiden, Antikörper zu binden. Um die nicht für Lipoprotein spezifischen Antikörper zu entfernen, wird in jedem mit diesem Antiserum durchgeführten Test der Hämolyse-Inhibierung 1 µg Muropeptide zugesetzt.

Zum zweiten kann nicht ausgeschlossen werden, daß das für die Immunisierung verwendete Lipoprotein geringfügig mit Lysozym kontaminiert ist (etwa in der Größenordnung von 1% oder weniger, was auf dem Aminosäure-Analysator nicht feststellbar wäre). Das Antiserum würde dann Antikörper gegen Lysozym enthalten. Tatsächlich bindet 1 µg Lysozym 10-15 % der Antikörper, eine größere Menge inhibiert jedoch nicht stärker. Neben Muropeptiden ist daher auch 1 µg Lysozym in jedem Test mit diesem Antiserum zugegen.

Nun zum Lipid-Teil des Lipoproteins: Lipide sind normalerweise keine Antigene. In diesem Fall ist jedoch das Lipid an ein größeres Molekül gebunden und könnte dadurch wie die Haptene als Antigen wirksam werden. Die gegen diese Region produzierten Antikörper würden nun vielleicht mit nichtgebundenen Phospholipiden reagieren können. Um diese Möglichkeit zu testen, werden 50 µg

Phosphatidyläthanolamin bei 56°C für 1 Std. mit 1 mg Rinderserum Albumin (BSA) in 0.5 ml 0.1 N NaOH inkubiert. Die leicht trübe Lösung wird dann neutralisiert und 2.5 µg werden für die Hämolyse-Inhibierung benutzt. Man erhält nur wenig Inhibierung (10%). BSA wird verwendet, weil bekannt ist, daß Lipide leicht an dieses Protein binden. Dies erleichtert ihre Solubilisierung in wässriger Lösung und simuliert die Protein-Lipid-Wechselwirkung, die man in Zellmembranen findet. In diesem Zusammenhang wurde noch getestet, ob die Fähigkeit des Murein-Lipoproteins, Antikörper zu binden, durch die Gegenwart von BSA beim Prozess der Alkali-Solubilisierung verstärkt wird. Dies ist nicht der Fall.

Der Murein-Lipoprotein-Komplex wird aus den E.coli-Zellhüllen durch Kochen in SDS präpariert, wobei alle anderen Komponenten gelöst werden; die unlöslichen Sacculi werden dann abzentrifugiert. Eine geringe Kontamination mit Lipopolysaccharid (LPS) könnte dabei vorkommen. Diese würde wiederum auf dem Aminosäure-Analysator nicht entdeckt werden, da die LPS-Komponente Glucosamin vom Glucosamin des Mureins selbst überlagert würde und Äthanolamin nur schlecht vom Ammoniak-Gipfel abzutrennen ist. Eine solche Kontamination des M-MLP würde nach Lysozym-Spaltung und Chromatographie mit dem Lipoprotein verbleiben. LPS ist ein hochwirksames Antigen. Es ist daher sehr wichtig, die Möglichkeit auszuschließen, daß das gegen "Lysozym-Lipoprotein" präparierte Antiserum Antikörper gegen LPS enthält.

Zuerst wird reines LPS aus E.coli B/r nach (18) präpariert, seine Reinheit auf dem Aminosäure-Analysator getestet und im

Hämolyse-Test eingesetzt, um zu sehen, ob es Antiserum gegen Lipoprotein inhibiert. Dies ist nicht der Fall. Es ist darüberhinaus auch von H. Mayer (Freiburg; persönliche Mitteilung) gezeigt worden, daß Antiserum gegen reines LPS Lipoprotein-beschichtete Erythrozyten nicht agglutinieren kann. Umgekehrt kann auch die Hämagglutination, die man mit LPS-Erythrozyten und Antiserum gegen LPS erhält, durch Lipoprotein nicht inhibiert werden.

Insgesamt kann man also folgern, daß die Hauptmenge der Antikörper im Antiserum gegen "Lysozym-Lipoprotein" nicht gegen mögliche Kontaminanten (Lysozym oder LPS) und auch nicht gegen mögliche unspezifische Determinanten (Lipid oder Muropeptide) gerichtet ist.

3.8.2 Der Effekt von Lysozym

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Hämolyse-Inhibierung durch Lysozym-gespaltene Proben im Vergleich mit ungespaltenen Proben. Man sieht, daß Lysozym-Spaltung die Inhibierungs-Aktivität erhöht. Lysozym-behandelte Zellhüllen inhibieren mehr als doppelt soviel Antikörper als nichtbehandelte Proben und im Falle des Murein-Lipoprotein-Komplexes ist der Faktor mehr als 10.

Lysozym verursacht die Erhöhung in der Aktivität wahrscheinlich durch bessere Offenlegung der Antigen-Determinanten und erleichtert dadurch die Wechselwirkung mit den Antikörpern. Dies bedeutet, daß die Determinanten vor der Lysozym-Spaltung schlecht zugänglich sind und es ist naheliegend, anzunehmen, daß diese am

C-terminalen Ende des Lipoproteins lokalisiert sind. Interessanterweise ist zu bemerken, daß das einzige vorhandene Tyrosin im Lipoprotein sich als Teil der Bindungsstelle zum Murein am C-terminalen Ende befindet. Es könnte sein, daß diese Aminosäure eine wichtige Rolle in der Antigenität spielt, denn es ist bekannt, daß Tyrosin-Reste normalerweise starke Antigen-Determinanten sind (39).

Probe	Protein-Gehalt	Behandlung	%Antikörper gebunden
Zellhülle	1 µg	-	25
Zellhülle	2 µg	-	34.5
Zellhülle	1 µg	Lysozym	42
Zellhülle	2 µg	Lysozym	64
M - MLP	1 µg	-	12
M - MLP	5 µg	-	17
M - MLP	1 µg	Lysozym	58
M - MLP	5 µg	Lysozym	86.6

Tabelle 5: Effekt von Lysozym

Zellhüllen und M-MLP werden präpariert, wie in Material und Methoden beschrieben. Der Protein-Gehalt wird mit der Ninhydrin-Methode bestimmt. Die Proben werden vor der Alkali-Solubilisierung bei 37°C für 2-14 Std. mit Lysozym gespalten (Lysozym:Substrat ungefähr 1:20). Der Grund dafür ist, daß in manchen Fällen bei Zugabe des Lysozyms etwas Material ausfällt; durch die nachfolgende Alkali-Solubilisierung ist gesichert, daß Zell-Proben optimal für den Hämolyse-Inhibierungstest gelöst werden.

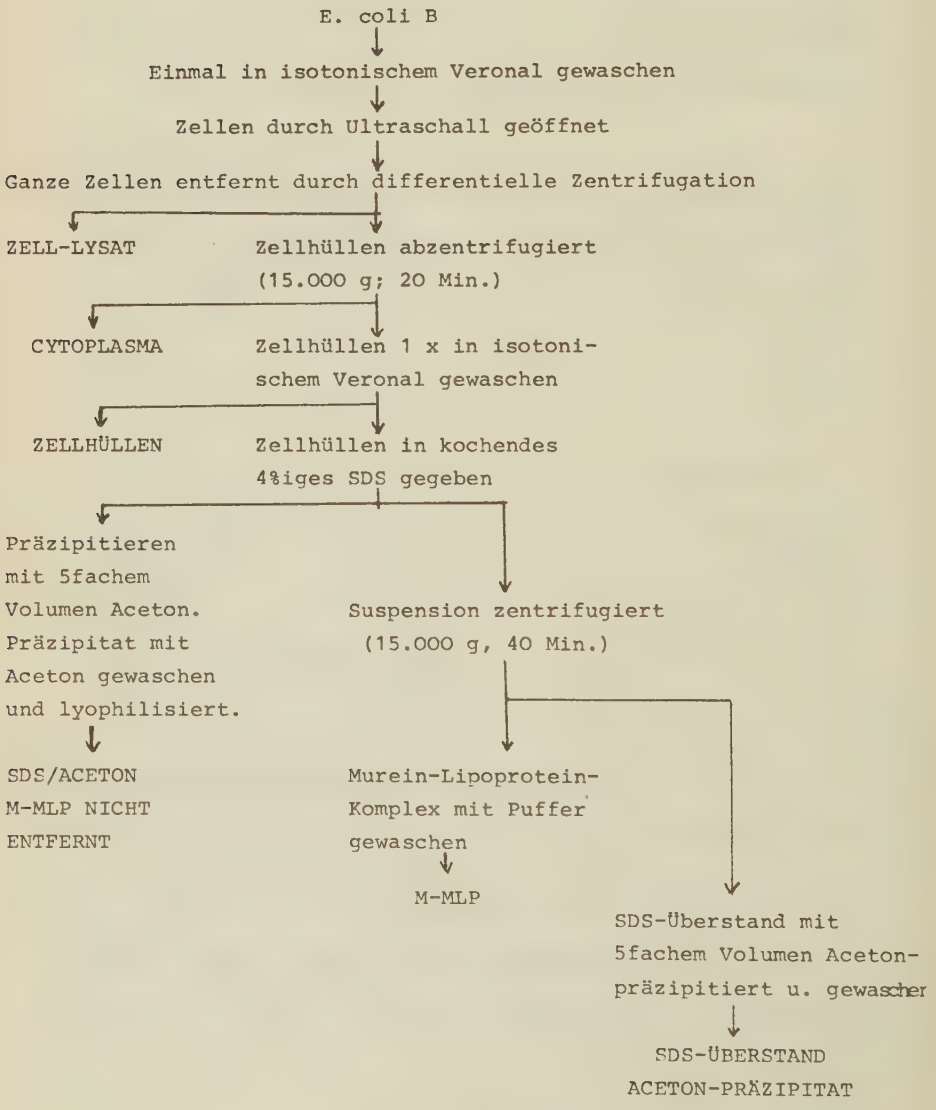
Der Effekt des Lysozyms auf M - MLP ist stärker als auf die Zellhüllen. Dies wahrscheinlich deshalb, weil Ersteres (M-MLP) durch SDS-Behandlung denaturiert wurde und oft in lyophilisierter Form aufbewahrt wurde. Die Zugänglichkeit des C-terminalen Endes ist vor Lysozym-Spaltung im Vergleich zu einer nativen Zellhüllen-Fraktion möglicherweise reduziert.

In der Folge werden Proben, die auf immunologische Kreuzreaktion getestet werden sollen, mit Lysozym gespalten, um optimale Hämolyse-Inhibierung zu erreichen. Um Vergleiche zwischen verschiedenen Proben anstellen zu können, muß deswegen gesichert sein, daß die Lysozym-Spaltungen gleich wirksam waren.

3.8.3 Verteilung der inhibierenden Aktivität in E.coli

Die Versuchsfolge zur Präparierung von Zellfraktionen für die Bestimmung der Aktivitätsverteilung innerhalb der Zellen ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Ergebnisse der Hämolyse-Inhibierung durch diese Fraktionen sind in Tabelle 6 Zusammengefaßt. Obwohl die Ergebnisse quantitativ schwanken, manchmal um einen Faktor von mehr als Zwei, ist der allgemeine Trend folgender: das Meiste (etwa 90%) der inhibierenden Aktivität ist in der Zellhülle lokalisiert. Dieser Hauptanteil kann weiter fraktioniert werden auf zweierlei Wegen: a) in innere und äußere Membran mit der Osborn-Methode (34), wobei sich herausstellt, daß der größte Teil des kreuzreagierenden Materials sich in der äußeren Membran befindet oder b) in SDS-unlösliches Material (M - MLP) und SDS-lösliches Material. Letzteres wird dann mit Aceton präzipitiert.

Abbildung 18 Zellfraktionierung zur Bestimmung der Verteilung von kreuzreagierendem Material innerhalb der Zelle



Probe	Durchschnittliche % LP
ganze Zellen	1.33
Zellhüllen	16.3
Cytoplasma	0.24
M - MLP	82.5
SDS-Überstand Aceton-Präzipitat (kein M-MLP)	0.4
SDS/Aceton (M-MLP nicht entfernt)	33.0
Cytoplasmamembran	1.6
äußere Membran	16.2

Tabelle 6: Verteilung der inhibierenden Aktivität in E.coli

Die Proben werden, wie im Versuchsprotokoll dargestellt (Abbildung 18), präpariert. Die Protein-Konzentration wird mit der Ninhydrin-Methode bestimmt. Vor dem Test werden alle Proben mit Lysozym gespalten und mit Alkali solubilisiert. Die % LP können abgelesen werden aus Abbildung 17b, in der µg reines Lipoprotein gegen % gebundene Antikörper aufgetragen sind. In der Tabelle sind die Durchschnittswerte aus mindestens 3 Experimenten angegeben.

In diesem Fall zeigt nur M-MLP inhibierende Aktivität, wogegen SDS-Überstand/Aceton-Präzipitat nur 10% der gesamten in der Zellhülle vorhandenen Aktivität enthält, eine Menge, die auf nicht abzentrifugierte Fragmente des M-MLP zurückgeführt werden kann. Nun ist nach Inouye (26) die doppelte Menge des Lipoproteins in freier, nichtgebundener Form vorhanden. Dieses freie LP würde nach Entfernung des M-MLP im SDS-Überstand bleiben und mit Aceton präzipitiert werden. Der Befund, daß SDS-Überstand/Aceton-Präzipitat praktisch inaktiv ist, deutet darauf hin, daß das freie Lipoprotein nicht mit Antikörpern gegen "Lysozym-Lipoprotein" kreuzreagieren kann. Um dies zu erklären, könnte man an-

nehmen, daß die Aceton-Präzipitierung die Antigenität zerstört. Dies läßt sich testen, indem man Zellhüllen in SDS löst und mit Aceton präzipitiert, ohne M-MLP zu entfernen. Nach Lysozym-Spaltung ist diese Probe genauso aktiv wie unbehandelte Zellhüllen. Auch reines Lipoprotein kann in dieser Weise behandelt werden, ohne seine die Hämolyse inhibierende Aktivität zu reduzieren.

Aus diesen Ergebnissen muß man schließen, daß die Gegenwart einer Murein-Untereinheit am Lipoprotein wesentlich ist für seine Wechselwirkung mit dem Antiserum. Dies konnte in der Folge bestätigt werden.

3.8.4 Der Effekt von Trypsin (und Thermolysin)

Der Effekt von Trypsin auf Zellhüllen von E.coli ist beschrieben worden (7). Die empfindliche Bindung liegt zwischen dem Murein-Netzwerk und dem Lipoprotein - um genau zu sein, es ist die Lys-Arg-Bindung am C-terminalen Ende des Lipoproteins. Der übrige Teil des Lipoproteins ist ziemlich resistent gegen Trypsin, wahrscheinlich wegen seiner α-helikalen Konformation. Wenn eine Suspension von Zellhüllen mit Trypsin gespalten, anschließend in SDS gelöst und zentrifugiert wird, erhält man Lipoprotein-freies Murein im Sediment und einen mit Aceton präzipitierbaren Überstand. Letzteres sollte das vom Murein abgespaltene, ansonsten aber unverdaute Lipoprotein enthalten. E.coli-Zellhüllen werden verschieden lang mit Trypsin gespalten. Die optische Dichte der Suspension sinkt innerhalb von 2 Min. auf 40-60% der ursprünglichen O.D. ab, weitere Spaltung verursacht jedoch keine weitere Abnahme in der O.D. Beim Test sol-

cher Zellhüllen auf Hämolyse inhibierende Aktivität ergibt sich, daß eine kurze Trypsin-Behandlung (etwa 5 Min.) die Aktivität im Vergleich zu einer unbehandelten Probe nicht reduziert, obwohl die O.D. bereits abgenommen hat. Eine Trypsin-Spaltung für 40 Min. jedoch reduziert die inhibierende Aktivität der Zellhülle auf etwa 10-25%.

Die Trypsin-gespaltenen Hüllen werden dann in SDS-lösliches und unlösliches Material fraktioniert. Unbeeinflußt von der Dauer der Spaltung sind die SDS-Überstände/Aceton-Präzipitate nicht aktiver als identische Proben von unbehandelten Zellhüllen. Das vom Murein in den SDS-Überstand entlassene Lipoprotein reagiert also nicht mit den Antikörpern. Es muß gefolgert werden, daß die Antikörper-Bindungsstelle in SDS unlöslich geblieben ist.

Untersucht man dieses SDS-unlösliche Material (d.h. die Sacculi) weiter, sieht man, daß die Reduktion in der inhibierenden Aktivität der Zellhüllen nach längerer Trypsin-Einwirkung (40 Min.) mit einer Reduktion der inhibierenden Aktivität der Murein-Sacculi einhergeht. Auf molarer Basis (Mole Muraminsäure) inhibiert M-MLP von unbehandelten Zellhüllen mehr als 4 x besser als Sacculi aus Zellhüllen, die für 40 Min. Trypsin-gespalten worden waren. Aminosäure-Analysen von diesem letzteren Material zeigen immer noch zusätzliche Aminosäuren neben den Mureinspezifischen Komponenten. Die Mengenanteile dieser Aminosäuren sind zwar gering, könnten aber immer noch auf eine kleine Anzahl Murein-gebundener Lipoprotein-Moleküle zurückzuführen sein.

Eine weitere Inkubation mit Trypsin oder Thermolysin verursacht dann eine vollkommene Ablösung von Protein bei gleichzeitiger Abnahme der inhibierenden Aktivität auf ca. 10%. Trotzdem kann dieses Material, allerdings bei einer 10fachen Konzentration gegenüber unbehandelten Sacculi, noch immer vollständige Inhibierung der Hämolyse verursachen. Es ist nicht bekannt, ob eine sehr geringe Menge an Lipoprotein, auf dem Aminosäure-Analysator nicht mehr feststellbar, nicht weggespalten worden ist und für die restliche Inhibierung verantwortlich ist.

3.8.5 Der Effekt von Pronase

Murein-Lipoprotein wird 30 Min. lang bei 60°C mit Pronase abgebaut (Protein:Enzym 10:1) und dann für 30 Min. bei 100°C inkubiert, um das Enzym zu zerstören. Kontrollproben mit a) ungespaltenem Lipoprotein und b) mit Pronase allein werden gleich behandelt. Das Ergebnis ist, daß die Pronase-Spaltung (und nicht die Inkubation bei 100°C) die Antigeneigenschaft des Lipoproteins vollständig zerstört.

3.8.6 Chemische Modifizierung des Tyrosins durch Jodierung und Nitrierung

Da das Lipoprotein nur einen einzigen Tyrosin-Rest, aber kein Phenylalanin oder Tryptophan enthält, wird nach Jodierung oder Nitrierung des "Lysozym-Lipoproteins" Tyrosin 56 modifiziert.

Die Jodierung wird wie in (17) beschrieben ausgeführt.

Etwa 20 molare Äquivalente (d.h. 1µmol = 0.1 ml einer 0.01 M J_2-Lösung in 0.5 M KJ) werden zu 0.5 µg alkali-solubilisiertem Lysozym-Lipoprotein in 1 ml 0.1 M Tris-HCl pH 9.2 zugesetzt und für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Probe und eine Kontrolle, außer der Zugabe von J_2 identisch behandelt, werden über Nacht gegen Wasser dialysiert. Die Aminosäure-Analyse zeigt, daß die Jodierung erfolgreich war, da der Tyrosin-Gipfel der iodierten Proben nur etwa 10% der Kontrolle ausmacht. Beide Proben sind im Test auf Hämolyse-Inhibierung gleich aktiv.

Die Nitrierung wird durchgeführt, wie in (38) beschrieben. Wiederum zeigt die Aminosäure-Analyse kein Tyrosin mehr (d.h. die Nitrierung war vollständig). Sowohl nitrierte wie nichtbehandelte Proben zeigen die gleiche inhibierende Aktivität, was die Schlußfolgerung bedingt, daß Tyrosin in der Antigen-Determinante nicht direkt beteiligt ist.

3.8.7 Inhibierende Aktivität in Bacillus brevis

Präpariert man Zell-Lysate von B. brevis, wie in Abbildung 18 beschrieben, so zeigen sie eine inhibierende Aktivität, die der in E.coli vergleichbar ist. Dies ist sehr überraschend, da man nicht erwartet, daß grampositive Bakterien Lipoprotein enthalten. Tatsächlich zeigen alle getesteten Stämme, sowohl grampositive als auch gramnegative, inhibierende Aktivität gegen "Lysozym-Lipoprotein". Dies deutet sehr stark darauf hin, daß die Inhibierung durch Komponenten verursacht wird, die nicht für das Lipoprotein spezifisch sind. Um diese Situation zu klären,

wird B. brevis mehr im Detail untersucht.

Die Verteilung der inhibierenden Aktivität innerhalb der Zellen ist genau analog zu E.coli - die Aktivität ist ausschließlich im Murein-Sacculus lokalisiert. Dieser wird dann in größerer Menge präpariert und in Aminosäure-Analysen zeigt sich, daß er kein Protein enthält. Nach Lysozym-Spaltung zeigt der Sacculus hohe inhibierende Aktivität.

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, daß eine Murein-Untereinheit am Lysozym-Lipoprotein für die Inhibierung der Hämolyse absolut notwendig ist. In Abschnitt 3.8.3 ist gezeigt, daß die Polypeptidkette allein die Hämolyse-Kurve nicht inhibieren kann. Obwohl lyophilisierte Muropeptide das Antiserum nicht inhibieren (Abschnitt 3.8.1), inhibiert reines Murein von B. brevis nach Lysozym-Spaltung (der Grund für diese Diskrepanz ist nicht klar, es kann jedoch vermutet werden, daß die sterische Konformation eine Rolle spielt). Auf jeden Fall ist das Antiserum nicht spezifisch für Lipoprotein und ist deshalb für die Lösung der in Abschnitt 3.7 angeschnittenen Fragen ungeeignet.

3.9. Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein

Die Herstellung von reinem, zuckerfreiem LP ist in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, die Immunisierungsmethode ist identisch mit der für "Lysozym-Lipoprotein". Die vollständige Abwesenheit von Muraminsäure in Aminosäure-Analysen verifiziert, daß es in dem Sinne wirklich "zuckerfrei" ist, als keine Murein-Untereinheit

mehr angelagert ist. Zuerst wird dann sichergestellt, daß das Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein weder durch Trypsin allein noch durch Lipopolysaccharide inhibiert wird.

3.9.1 Kreuzreaktion zwischen Antiseren gegen zuckerfreies und "Lysozym-Lipoprotein".

Abbildung 19 a, b zeigen die Ergebnisse von Kreuzreaktions-Experimenten zwischen zuckerfreiem-, Lysozym-Lipoprotein und den entsprechenden Antiseren. Es ist absolut keine Kreuzreaktion zu finden. Die Antiseren können Erythrozyten in der Gegenwart von Komplement nur lysieren, wenn die Erythrozyten mit dem entsprechenden Lipoprotein beschichtet sind (d.h. Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein kann Lysozym-Lipoprotein-beschichtete Erythrozyten nicht lysieren und umgekehrt). Ebenso können die einzelnen Lipoprotein-Präparate nur deren entsprechende Hämolyse-Kurven inhibieren. Dies bedeutet, daß die Antigen-Determinanten in den beiden Präparationen nicht die gleichen sind. Da sich die Moleküle nur an ihrem C-Terminus unterscheiden, wird daraus geschlossen, daß in beiden Fällen der C-Terminus die Antigen-Determinante repräsentiert.

3.9.2 Der Effekt von Trypsin

Alkali-solubilisierte Proben, von denen man weiß, daß sie Murein-Lipoprotein enthalten, zeigen keine Hämolyse-inhibierende Aktivität, wenn sie nicht vorher mit Trypsin gespalten wurden. So inhibieren z.B. 5 µg E.coli-Zellhüllen ohne Trypsin-Spaltung nur 7% der Antikörper gegen zuckerfreies Lipoprotein, während

1 µg Trypsin-gespaltene E.coli-Zellhüllen 70% der Antikörper inhibieren. Die Trypsin-Spaltung (Enzym:Protein 1:10) findet vor der Alkali-Solubilisierung für 30 Min. bei 37°C statt. Auch 0.5 µg Lysozym-Lipoprotein, wenn es zusätzlich mit Trypsin behandelt wird, inhibiert die Hämolyse-Kurve beinahe vollständig (90%). Dies bestätigt wiederum, daß die Antigen-Determinante nur nach Trypsin-Spaltung zugänglich wird. Es ist der C-Terminus des zuckerfreien Lipoproteins.

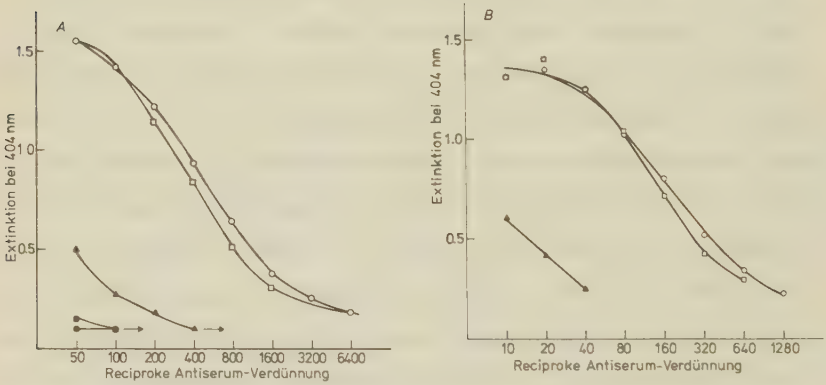


Abbildung 19 a Kreuzreaktion zwischen Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein und Lysozym-Lipoprotein

Der Test auf Hämolyse-Inhibierung wird, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. In allen Fällen ist das verwendete Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein gerichtet.

Die Hämolyse-Kurven sind:

o - mit Erythrozyten, beschichtet mit zuckerfreiem Lipoprotein

▲ - mit Erythrozyten, beschichtet mit Lysozym-Lipoprotein

● - mit unbeschichteten Erythrozyten

□ - mit Erythrozyten, beschichtet mit zuckerfreiem Lipoprotein und inhibiert durch 1 µg Lysozym-Lipoprotein

■ - mit Erythrozyten, beschichtet mit zuckerfreiem Lipoprotein und inhibiert durch 0.5 µg zuckerfreies Lipoprotein.

Abbildung 19 b Kreuzreaktion zwischen Antiserum gegen Lysozym-Lipoprotein und zuckerfreiem Lipoprotein

In allen Fällen ist das Antiserum gegen Lysozym-Lipoprotein gerichtet. Die Hämolyse-Kurven sind:

o - mit Erythrozyten, beschichtet mit Lysozym-Lipoprotein

▲ - mit Erythrozyten, beschichtet mit zuckerfreiem Lipoprotein

□ - mit Erythrozyten, beschichtet mit Lysozym-Lipoprotein und inhibiert durch 2 µg zuckerfreies Lipoprotein

3.9.3 Der Effekt von Carboxypeptidase b

Trypsin spaltet zwischen der Carboxylgruppe von basischen Aminosäuren und deren benachbarten Resten, d.h. die erhaltenen Produkte haben C-terminale Lysin- oder Arginin-Reste. Dies ist auch der Fall beim zuckerfreien Lipoprotein, das durch Trypsin-Spaltung des M-MLP hergestellt worden ist. Da die Ergebnisse bis jetzt zwingend auf den C-Terminus als Antigen-Determinante hindeuten, wird nun getestet, ob Vorbehandlung mit Carboxypeptidase b (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) die inhibierende Aktivität des zuckerfreien Lipoproteins zerstört. Dies ist der Fall. 0.5 µg zuckerfreies LP, in 0.01 M $NaH_2 PO_4$ pH 7.5 bei 37°C für 5-13 Std. mit Carboxypeptidase b (Enzym:Protein 1:20) inkubiert, zeigt

keine inhibierende Aktivität, wogegen 0.5 µg unbehandelte Probe vollständig inhibiert. Die inhibierende Aktivität wird nur durch Carboxypeptidase b, nicht durch Carboxypeptidase A, zerstört.

Aminosäure-Analysen der mit Carboxypeptidase b behandelten Probe zeigen, daß durchschnittlich 1 Lys (es gibt nun 4 Lys-Reste im Lipoprotein) abgespalten worden ist. Dies würde bedeuten, daß zusätzlich zur Spaltung zwischen Arg 57 und Lys 58 das Trypsin zwischen Lys 55 und Tyr 56 gespalten hat (siehe Lipoprotein-Sequenz auf Seite 38). Dies kann durch sorgfältige Aminosäure-Analyse des hydrolysierten zuckerfreien Lipoproteins bestätigt werden, wobei sich zeigt, daß der Tyrosin-Rest nicht mehr vorhanden ist. Dieser Befund ist nicht überraschend, wenn die Lys-Tyr-Bindung außerhalb der α-helikalen Region des LP liegt und deshalb für die Trypsin-Spaltung zugänglich ist. Das abgespaltene Dipeptid Tyr-Arg bleibt bei Präzipitierung des zuckerfreien Lipoproteins im Überstand.

Der Effekt von Carboxypeptidase b, nämlich die Zerstörung der Antigen-Eigenschaft des zuckerfreien Lipoproteins, zeigt eindeutig, daß das C-terminale Lys 55 die alleinige Antigen-Determinante ist.

3.9.4 Verteilung der inhibierenden Aktivität innerhalb von E.coli

Da das Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein gegen das C-terminale Lys 55 gerichtet ist, kann nach Trypsin-Spaltung nur fertig synthetisiertes Lipoprotein kreuzreagieren. Proteine wer-

den vom N-Terminus in Richtung zum C-Terminus synthetisiert, weshalb unvollständige Lipoprotein-Polypeptide an Ribosomen mit keinem der bis jetzt beschriebenen Antiseren nachgewiesen werden können.

Es werden Zellfraktionen präpariert, wie in Abbildung 18 dargestellt. Alle Proben werden vor dem Test und vor der Alkali-Solubilisierung für 30 Min. bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Zunächst werden Zellhüllen präpariert, indem die Zellen durch Ultraschall geöffnet und die Hüllen bei 18 000 g für 30 Min. abzentrifugiert werden. Beim Vergleich der Aktivität von Zellhüllen und Cytoplasma stellt sich heraus, daß ca. 30% der Gesamt-Aktivität im Cytoplasma verbleiben. Es ist möglich, daß diese große Menge an inhibierender Aktivität von Lipoprotein stammt, das während der Ultraschall-Behandlung aus den Zellhüllen herausgelöst worden ist. Um dies zu testen, werden nach der Osborn-Methode Sphaeroplasten gemacht und durch Verdünnen in Wasser lysiert. Die Zellmembrane enthalten nach Sedimentation bei 140 000 g für 2 Std. 93% der gesamten inhibierenden Aktivität. Damit dürfte klar sein, daß Ultraschall-Aufschluß tatsächlich inhibierendes Material aus den Zellhüllen herauslöst.

Als Nächstes werden Zellhüllen in SDS-lösliches und SDS-unlösliches Material (M-MLP) fraktioniert. Beide zeigen nach Trypsin-Spaltung (nicht jedoch ohne Spaltung) inhibierende Aktivität. Der Befund, daß auch das SDS-lösliche Material aktiv ist, bestätigt Inouye's Ergebnis, daß auch ein nicht Murein-gebundenes Lipoprotein existiert. Um die Menge des "freien" im Vergleich

zum gebundenen Lipoprotein zu bestimmen, werden 2 gleiche Mengen von E.coli-Zellhüllen in kochendem SDS gelöst. Eine Probe wird direkt mit Aceton gefällt (d.h. M-MLP ist noch vorhanden), die andere Probe wird zentrifugiert und nur der Überstand mit Aceton gefällt. Nach Trypsin-Spaltung zeigt sich, daß beide Proben etwa gleich viel inhibierende Aktivität aufweisen. Insgesamt entspricht die Aktivität der von Zellhüllen, was bedeutet, daß SDS-Solubilisierung/Aceton-Fällung die inhibierende Aktivität nicht reduzieren. Nach Inouye sollte der präzipitierte SDS-Überstand nur 60-70% der in der Zellhülle vorhandenen Aktivität aufweisen. Im Test auf Hämolyse-Inhibierung ist dieser Unterschied nicht feststellbar, vermutlich aufgrund der Ineffizienz des Tests selbst. Gezeigt werden kann nur, daß eine große Menge an freiem Lipoprotein existiert.

Die Zellhüllen können ferner mit der Osborn-Methode in innere und äußere Membran getrennt werden. Die äußere Membran ist etwa 10 x aktiver als die innere Membran, z.B. inhibieren 0.25 µg H-Material fast genauso stark wie 2.5 µg L-Material (70%). Das meiste der in Cytoplasmamembran verbleibenden Aktivität ist sehr wahrscheinlich auf Kontamination von der äußeren Membran zurückzuführen. Folglich sind sowohl freies als auch gebundenes Lipoprotein ausschließlich in der äußeren Membran lokalisiert.

3.9.5 Inhibierung durch andere Bakterien-Spezies

Zell-Lysate von logarithmisch wachsenden Stämmen werden, wie in Abb. 18 dargestellt, präpariert und mit Trypsin behandelt. Tabelle 7 faßt die getesteten Stämme zusammen und gibt die Er-

gebnisse des immunologischen Kreuzreaktions-Tests mit zuckerfreiem Lipoprotein wieder. Wiederum ist Trypsin-Spaltung für die Manifestierung von inhibierender Aktivität absolut notwendig. Neben E.coli sind nur 3 Stämme aktiv-Shigella flexneri, Salmonella typhimurium und Citrobacter Kauffmann. In ihrem Ausmaß ist die gezeigte Aktivität vergleichbar zu der in E.coli. Alle anderen Stämme sind inaktiv. Interessanterweise ist auch Serratia marcescens inaktiv, obwohl gezeigt worden ist, daß sein Murein-Sacculus kovalent gebundenes Protein enthält, das eine ähnliche Aminosäure-Zusammensetzung wie das Murein-Lipoprotein von E.coli aufweist (8). Anders als bei E.coli und Salmonella jedoch läßt Pronase-Spaltung des M-MLP von Serratia nur Lysin (und nicht Lysin und Arginin) an den Mureinsacculus gebunden zurück. Dies deutet auf mögliche Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz am C-terminalen Ende des Serratia-Lipoproteins hin, was die Kreuzreaktivität verhindern würde.

Stämme	Kreuzreaktivität
Aerobacter aerogenes	-
Alcaligenes faecalis	-
Bacillus subtilis	-
Citrobacter	+
Escherichia coli	+
Erwinia uredovora	-
Klebsiella aerobacter	-
Proteus mirabilis	-
Providencia	-
Pseudomonas aeruginosa	-
Rhizobium leguminosarum	-
Salmonella typhimurium	+
Serratia marcescens	-
Shigella flexneri	+
Staphylococcus aureus	-
Xanthomonas hyacinthi	-

Tabelle 7: (siehe nächste Seite)

Tabelle 7: Kreuzreaktivität in verschiedenen Stämmen mit Antiserum gegen zuckerfreies Lipoprotein

3.10. Antiserum gegen hitze-getötete Bakterien

Wenn man hitzegetötete E.coli B/r-Zellen in Kaninchen injiziert, verursachen sie eine Produktion von Antikörpern gegen Oberflächen-Strukturen der E.coli-Zellen. Man kann den Titer der Antikörper, die spezifisch gegen das Lipoprotein gerichtet sind, durch Immunhämolyse oder Immun-Hämagglutination von Erythrozyten, die mit reinem Lipoprotein beschichtet sind, bestimmen. Die Antikörper-Produktion gegen Lipoprotein hängt davon ab, ob diese Moleküle der Erkennung durch den tierischen Immun-Apparat zugänglich sind. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Position des Lipoproteins innerhalb der äußeren Membran zu untersuchen. Experimente in dieser Richtung sind von H. Mayer (Freiburg) durchgeführt worden. Deren Ergebnisse sollen hier kurz dargestellt werden, um dann mit der Diskussion von Experimenten fortzufahren, die Information über die Antigen-Spezifität dieses Antilipoprotein-Serums geben.

Das Prinzip der zu schildernden Experimente beruht auf der Untersuchung von Mutanten in der äußeren Zellmembran. Dabei ist der Organismus nicht E.coli, sondern Salmonella, weil eine große Anzahl an LPS-Mutanten von Salmonella isoliert und aufgeklärt worden ist. Gegenüber dem Wildtyp ("smooth form") fehlen den Mutanten ("rough forms") verschiedene Teile des LPS. Um die Zu-

gänglichkeit des Lipoproteins in diesen Stämmen zu bestimmen, werden Kaninchen mit ihnen immunisiert und die Titer der gegen Lipoprotein produzierten Antiseren werden gemessen (Tabelle 8a). Zusätzlich wird die Fähigkeit der verschiedenen Stämme, Antiserum gegen reines Lipoprotein zu inhibieren, als weiterer Maßstab der Zugänglichkeit des Lipoproteins in diesen Stämmen, bestimmt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 8b dargestellt.

	STÄMME			
Reziproke Titer der Hämagglutination gegen LP	S/K^+ 4 Antiseren	S/K^- 6 Antiseren	R 10 Antiseren	R_1 8 Antiseren
5120				
2560				+ +
1280				+
640			+ + + +	+ + +
320			+	
160		+ +	+ + +	+ +
80		+	+	
40	+	+ +		
20	+	+		
10	+ +		+	

Tabelle 8a Produktion von Antiseren gegen Lipoprotein in Salmonella-Stämmen mit unterschiedlichem LPS

Die Immunizierung mit hitze-getöteten Zellen ist im Abschnitt 2.7.1 beschrieben, die passive Hämagglutination von Erythrozyten, beschichtet mit Lysozym-Lipoprotein, in Abschnitt 2.7.4. Die Salmonella-Stämme haben folgende Charakteristika: S/K^+, intaktes LPS, mit Capsid; S/K^-, intaktes LPS, kein Capsid; R, intakter LPS-Kern, keine O-Antigene und R_i, unvollständiger LPS-Kern. Diese Tabelle stammt von H. Mayer (persönliche Mitteilung).

Bakterium	Zellzahl/ml bei der Inhibierung	Reziproke Titer der Hämagglutination gegen LP					
		0	2	4	6	8	22
S 218	10^{11}	10.000	5.000	10.000	-	5.000	2.500
R 595			20	20		20	20

Tabelle 8b Inhibierung von Antikörpern gegen Lipoprotein durch "smooth"- und "rough"-Stämme von Salmonella.

Vor dem Test wird das Antiserum mit 10^{11} hitze-getöteten Bakterien/ml bei 12°C inkubiert. S 218 ist ein Wildtyp, R 595 eine Mutante mit nur sehr wenig LPS-Kern. Diese Tabelle stammt von H. Mayer (persönliche Mitteilung).

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß das Lipoprotein im Wildtyp ("smooth") fast überhaupt nicht zugänglich ist. Der "smooth"-Stamm kann weder die Produktion von Antiserum gegen Lipoprotein induzieren noch kann er reines Antilipoprotein-Serum inhibieren. In den "rough"-Stämmen jedoch, denen bestimmte Teile des LPS

fehlen, ist das Lipoprotein gegenüber dem Immun-Apparat zugänglich. Dieser Befund deutet darauf hin, daß sich das Lipoprotein relativ weit in die äußere Membran erstreckt bzw. sie vielleicht sogar ganz durchspannt. Hierzu ist nun sehr wichtig, die Spezifität des Antiserums gegen hitzegetötete Zellen zu bestimmen, um sicher zu sein, daß die eben geschilderten Ergebnisse in obiger Form interpretiert werden können (Vgl. Abschnitte 3.8 und 3.9, in denen gezeigt wurde, daß die Antiseren spezifisch gegen den C-Terminus des jeweiligen Lipoprotein-Moleküls gerichtet sind.)

Somit wird nun untersucht, ob das Antiserum gegen hitzegetötete Zellen von E.coli B/r Erythrozyten, die zum einen mit zukkerfreiem, zum anderen mit Lysozym-Lipoprotein beschichtet sind, lysieren kann (in Gegenwart von Komplement). Dies ist der Fall, was bedeutet, daß die Antigen-Determinante eine beiden Lipoprotein-Molekülen gemeinsame Struktur ist und daß die aus Tabelle 8 abgeleitete Schlußfolgerung korrekt ist. Bei der gemeinsamen Struktur muß es sich um einen Teil der Polypeptidkette (oder das Lipid) handeln. Überraschenderweise ergibt sich jedoch ein starker Unterschied (Faktor 10) in der Hämolyse, wenn man die Erythrozyten einerseits mit zuckerfreiem Lipoprotein beschichtet (1/2.500) und andererseits mit Lysozym-Lipoprotein (1/250). Der Grund für diese Diskrepanz konnte bis jetzt nicht geklärt werden.

3.11. Diskussion der immunologischen Experimente

Die Spezifitäten der drei Antiseren gegen a) Lysozym-Lipoprotein, b) zuckerfreies Lipoprotein und c) hitzegetötete

E.coli B/r-Zellen sind in den Abschnitten 3.8., 3.9. und 3.10 untersucht worden. Überraschenderweise zeigen alle drei Antiseren verschiedene Spezifität.

In den ersten beiden Fällen repräsentiert der C-Terminus die Antigen-Determinante - beim Lysozym-Lipoprotein ist es gebundenes Muropeptid und beim zuckerfreien Lipoprotein ist es Lys 55. Auch die α-helikale Polypeptidkette muß jedoch eine wichtige Rolle spielen, da weder reine, lyophilisierte Muropeptide allein noch Lysin allein die Antiseren inhibieren können. Unglücklicherweise konnte die Situation im Falle des Lysozym-Lipoprotein nicht vollständig geklärt werden. Reines, Lysozym-gespaltenes Murein kann das Antiserum inhibieren. Dementsprechend zeigen alle getesteten Bakterien-Stämme, auch die grampositiven, gegen dieses Antiserum inhibierende Aktivität. Dieses Antiserum ist damit nicht geeignet für die Bestimmung von Lipoprotein, denn es ist mindestens teilweise gegen Murein-Bausteine gerichtet.

Die Situation beim zuckerfreien Lipoprotein ist sehr viel klarer. Da Lys 55 am C-terminalen Ende mit Sicherheit die Antigen-Determinante darstellt, kann fertiges Lipoprotein in Proben, die mit Trypsin behandelt wurden (eine wesentliche Voraussetzung) spezifisch bestimmt werden. Fragen über die Verteilung des Lipoproteins innerhalb der E.coli-Zellen ebenso wie über das Vorkommen in anderen Bakterien-Stämmen können mit diesem Antiserum beantwortet werden (Abschnitte 3.9.4 und 3.9.5). Da jedoch die Proteine an den Ribosomen vom N-terminalen Ende her synthetisiert werden, können unvollendete Polypeptide an Ribosomen nicht bestimmt werden. Somit kann die in Abschnitt 3.7 vor-

geschlagene Fraktionierung der Ribosomen in "cytoplasmatische" und "membrangebundene" nicht angegangen werden.

Das dritte, gegen hitzegetötete E.coli B/r-Zellen präparierte Antiserum scheint gegen einen Teil der Polypeptidkette (oder das Lipid) gerichtet zu sein. In diesem Fall sind die Untersuchungen nicht so intensiv geführt worden und einige Diskrepanzen sind nicht eliminiert worden. Es hat jedoch zumindest den Anschein, daß die in Abschnitt 3.10 beschriebenen Untersuchungen von H. Mayer (Freiburg; persönliche Mitteilung) über die Zugänglichkeit des Lipoproteins in der äußeren Zellmembran auf einem spezifischen Antigen/Antikörper-System fundieren.

4. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation ist in drei Abschnitte aufgeteilt, die jedoch miteinander in Zusammenhang stehen.

Zuerst wird die Primärstruktur des Murein-Lipoproteins in der Zellwand von E.coli und seine Bindungsart an das Murein beschrieben. Die sehr repetitive Aminosäure-Sequenz des Lipoproteins läßt darauf schließen, daß das ursprüngliche Gen für 15 Aminosäuren kodierte und sich dann verdoppelte, wobei das Triplet für das C-terminale Lysin oder Arginin verloren ging. In der Folge wurde nur die Hälfte des ursprünglichen Gens viermal an das verdoppelte Gen angehängt. Mindestens 80% der Polypeptidkette ist α-helikal, und eine Seite der α-Helix ist hydrophob. Das Lipoprotein ist durch die ε-Aminogruppe seines C-terminalen Lysins und die Carboxylgruppe am optischen L-Zentrum der Diaminopimelinsäure an das Murein gebunden.

Im zweiten Abschnitt werden durch in vivo-Experimente einige Fragen über die letzten Schritte der koordinierten Biosynthese von Murein und Murein-Lipoprotein beantwortet. Nach Pulsmarkierung mit der Murein-spezifischen Komponente Diaminopimelinsäure werden die markierten Produkte in Zellhüllen und getrennten Membranen identifiziert. Es wird gezeigt, daß die cytoplasmatischen UDP-aktivierten Murein-Vorstufen in der Cytoplasmamembran an den C_{55}-Isoprenylphosphat-Träger gebunden und dann rasch auf einen polymerisierten Akzeptor in der äußeren Membran übertragen werden. Der Lipid-Träger selbst dringt dabei nicht in die äußere Membran ein. Ein weiterer Zwischenträger wird nicht gefunden. Der polymerisierte Akzep-

tor ist quervernetzt, ist aber SDS-löslich und enthält eine große Menge gebundenes Lipoprotein. Das nächste Produkt nach diesem SDS-löslichen Polymer ist SDS-unlöslich, enthält jedoch sehr wenig gebundenes Lipoprotein. Nur relativ "altes" Murein hat wieder Lipoprotein gebunden.

Im dritten Abschnitt werden die Spezifitäten von drei verschiedenen Antiseren untersucht, die gegen Lipoprotein präpariert wurden. Das erste Antiserum wurde gegen Lipoprotein präpariert, das durch Lysozym-Spaltung des Murein-Lipoproteinkomplexes gewonnen wurde. Es stellt sich heraus, daß das noch an das Polypeptid gebundene Muropeptid eine Hauptkomponente der Antigen-Determinante darstellt. Das bedeutet, daß dieses Antiserum nicht spezifisch für Lipoprotein ist; alle Proben, die Murein enthalten, können mit ihm reagieren. Das zweite Antiserum wurde gegen Lipoprotein aus Trypsin-gespaltenem Murein-Lipoprotein präpariert. Der C-terminale Lysin-Rest dieses Moleküls konnte als Antigen-Determinante identifiziert werden. Mit diesem Antiserum wurde gezeigt, daß in E.coli sowohl die "freie" als auch die gebundene Form des Lipoproteins ausschließlich in der äußeren Membran lokalisiert sind. Darüber hinaus zeigen Salmonella, Shigella und Citrobacter Kreuzreaktivität mit diesem Antiserum; diese Organismen enthalten ebenfalls Lipoprotein. Das dritte Antiserum wurde gegen hitzegetötete E.coli B/r-Zellen präpariert. Die in diesem Antiserum vorhandenen Antikörper gegen Lipoprotein sind offenbar gegen einen Teil der Polypeptidkette (oder gegen das Lipid) gerichtet. Mit Antiserum gegen ganze Zellen konnte gezeigt werden, daß das Lipoprotein sich weit in die äußere Membran erstreckt und sie vielleicht sogar ganz durchspannt.

5. Literaturverzeichnis

1. R.P. Ambler (1967) "Carboxypeptidases A and B". Meth. Enzymol. XI, Ed. C.H.W. Hirs, Acad. Press, New York and London, S. 436.

2. J.S. Anderson, M. Matsuhashi, M.A. Haskin, J.L. Strominger (1965) "Lipid-phosphoacetylmuramyl-Pentapeptide and Lipid-Phosphodisaccharide-Pentapeptide: Presumed Membrane Trans- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53,S. 881.

3. E.R. Arquilla, W.W. Bromer, D. Mercola (1969) "Immunology, Conformation and Biological Activity of Insulin". Diabetes 18, S. 193.

4. V. Braun (1971) "Zur Struktur, Funktion und Biosynthese des Murein-Lipoproteinkomplexes (Stützmembran) der Zellwand von Escherichia coli". Habilitationsschrift, Universität Tübingen.

5. V. Braun, V. Bosch (1972) "Repetitive Sequences in the Murein-Lipoprotein of the Cell Wall of Escherichia coli". Proc. Nat. Acad. Sci. 69, S. 970.

6. V. Braun, V. Bosch (1972) "Sequence of the Murein-Lipoprotein and the Attachment Site of the Lipid". Eur. J. Biochem. 28, S. 51.

7. V. Braun, K. Rehn (1969) "Chemical Characterization, Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipo- protein) of the E.coli Cell Wall". Eur.J.Biochem. 10, S. 426.

8. V. Braun, K. Rehn, H. Wolff (1970) "Supramolecular Structure of the Rigid Layer of the Cell Wall of Salmonella, Serratia, Proteus, and Pseudomonas fluorescens. Number of Lipoprotein Molecules in a Membrane Layer". Biochem. 9, S. 5041.

9. V. Braun, U. Sieglin (1970) "The Covalent Murein-Lipoprotein Structure of the Escherichia coli Cell Wall". Eur. J. Biochem. 13, S. 336.

10. V. Braun, H. Wolff (1970) "The Murein-Lipoprotein Linkage in the Cell Wall of Escherichia coli". Eur. J. Biochem. 14, S. 387.

11. G. Braunitzer, N. Hilschmann, V. Rudloff, K. Hilse, B. Liebold, R. Müller (1961) "The haemoglobin particles. Chemical and genetic aspects of their structure". Nature 190, S. 480.

12. M.S. Bretscher (1971) "Membrane Structure: Some General Principles". Science 181, S. 622.

13. D. Carlström (1962) "The polysaccharide chain of chitin". Biochim. Biophys. Acta 59, S. 361.

14. R.J. DeLange, E. Smith (1971) in "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) vol. 3, S. 8, Academic Press, New York.

15. D.A. Fischman, G. Weinbaum (1967) "Hexagonal Pattern in Cell Walls of Escherichia coli B". Science 155, S. 472.

16. J.E. Folk (1971) in "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) vol. 3, S. 57, Academic Press, New York.

17. H. Fraenkel-Conrat (1957) "Methods for Investigating the Essential Groups for Enzyme Activity" in Meth. Enzymol. IV.Ed. S.P. Colowich and N.O. Kaplan, Acad. Press, New York and London, S. 247.

18. C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal (1969) "A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides". Eur. J. Biochem. 9, S. 245.

19. J.M. Ghuysen, G.D. Shockman (1973) "Membranes and Walls of Bacteria", ed. L. Leive, S. 37-130, New York, M. Dekker.

20. R. Hakenbeck, E.W. Goodell, U. Schwarz (1974) "Compartmentalization of Murein Hydrolases in the Envelope of Escherichia coli". FEBS Letters 40, S. 261.

21. J. Hamlin, I. Zabin (1972) "ß-Galactosidase: Immunological Activity of Ribosome-Bound, Growing Polypeptide Chains". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, S. 412.

22. K. Hantke, V. Braun (1973) "Covalent Binding of Lipid to Protein". Eur. J. Biochem. 34, S. 284.

23. R. Hartmann, J-V. Höltje, U. Schwarz (1972) "Targets of Penicillin Action in Escherichia coli". Nature 235, S. 426.

24. A. Hirashima, G. Childs, M. Inouye (1973) "Differential Inhibitory Effects of Antibiotics on the Biosynthesis of Envelope Proteins of E.coli". J. Mol. Biol. 79, S. 373.

25. A. Hirashima, M. Inouye (1973) "Specific Biosynthesis of an Envelope Protein of Escherichia coli". Nature 242, S. 405.

26. M. Inouye, J. Shaw, C. Shen (1972) "The Assembly of a Structural Lipoprotein in the Envelope of Escherichia coli". J. Biol. Chem. 247, S. 8154.

27. K. Izaki, M. Matsuhashi, J.L. Strominger (1968) "Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls-Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: Penicillin sensitive enzymatic reaction in strains of Escherichia coli". J. Biol. Chem. 243, S. 3180.

28. E.A. Kabat, M.M. Mayer (1961) In: "Experimental Immunochemistry", 2nd ed., S. 149. C.C. Thomas, Springfield, Ill.

29. "Bacterial Lipopolysaccharides ", ed. E.H. Kass and S.M. Wolff, The University of Chicago Press, Chicago, London 1973.

30. N. Lee, M. Inouye (1974) "Outer Membrane Proteins of Escherichia coli: Biosynthesis and Assembly". FEBS Letters 39, S. 167.

31. O. Lüderitz, personal communication.

32. O. Lüderitz, O. Westphal, A.M. Staub, H. Nikaido (1971) "Isolation and Chemical and Immunological Characterization of Bacterial Lipopolysaccharides" in Microbial Toxins, Ed. G. Weinbaum, J. Kadis, S.J. Ajl, Academic Press, New York and London, S. 145.

33. M.J. Osborn, J.E. Gander, E. Parisi (1972) "Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella typhimurium - Site of Synthesis of Lipopolysaccharide". J. Biol. Chem. 247, S. 3973.

34. M.J. Osborn, J.E. Gander, E. Parisi, J. Carson (1972) "Mechanism of Assembly of the Outer Membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and Characterization of Cytoplasmic and Outer Membrane". J. Biol. Chem. 247, S. 3962.

35. L. Oxender (1972) "Membrane Transport". Ann. Rev. of Biochem. 41, S. 777.

36. M.F. Perutz, J.C. Kennedy, H.D. Watson (1965) "Structure and function of haemoglobin. Some Relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence". J. Mol. Biol. 13, S. 669.

37. G. Pfleiderer, P.G. Celliers (1963) "Isolierung einer Aminopeptidase aus Nierenpartikeln". Biochem. Z. 339, S. 186.

38. G.F. Riordon, B.L. Vallee (1972) "Nitration with Tetranitromethane" in Meth. Enzymol. XXV. Ed. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff, Acad. Press, New York and London, S. 512.

39. M. Sela (1972) "Antigen Design and Immune Response". The Harvey Lecture Series 67, S. 213.

40. S.J. Singer, G.L. Nicolson (1972) "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes". Science 175, S. 720.

41. J.L. Strominger (1969) "Inhibitor Tools in Cell Research" ed. Th. Bücher, H. Sies, New York: Springer. S. 187.

42. M. Takeshita, P.H. Mäkelä (1971) "Glucosylation of Lipopolysaccharide in Salmonella: Biosynthesis of O-Antigen Factor 12". J. Biol. Chem. 246, S. 3920.

43. D.J. Tipper (1968) "Alkali-Catalyzed Elimination of D-Lactic Acid from Muramic Acid and Its Derivatives and the Determination of Muramic Acid". Biochemistry 7, S. 1441.

44. J.N. Umbreit, J.L. Strominger (1972) "Isolation of the Lipid Intermediate in Peptidoglycan Biosynthesis from Escherichia coli". J. Bact. 112, S. 1306.

45. K. Vambutas, M.R.J. Salton (1970) "Incorporation of ^{14}C Glycine into Micrococcus lysodeikticus Membrane Protein and Effects of Protein Synthesis Inhibitors". Biochim. Biophys. Acta 203, S. 83.

46. H.J. Vogel, D.M. Bonner (1956) "Acetylornithinase of Escherichia coli: Partial Purification and Some Properties". J. Bio. Chem. 218, S. 97.

47. J.B. Ward, H.R. Perkins (1973) "The Direction of Glycan Synthesis in a Bacterial Peptidoglycan". Biochem. J. 135, S. 721.

48. K. Weber, M.J. Osborn (1969) "The Reliability of Molebular Weight Determinations by Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis". J. Biol. Chem. 244, S. 4406.

49. W. Weidel, H. Pelzer (1964) "Bagshaped Macromolecules - A new Outlook on Bacterial Cell Walls". Advan. Enzymol. 26, S. 193.

Lebenslauf

Am 4. Januar 1948 wurde ich in Glasgow, Schottland, geboren.

Von 1953 bis 1965 besuchte ich die Glasgow High School for Girls, von 1965 bis 1969 studierte ich an der Glasgow University Biochemie. Im Juli 1969 schloß ich mit dem Bachelor of Science (Honours in Biochemistry) das Studium ab. Von Oktober 1969 bis Dezember 1971 arbeitete ich bei Dr. V. Braun am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Henning, in Tübingen. Die vorliegende Doktorarbeit begann ich im Januar 1972 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, unter der Anleitung von Prof. Dr. V. Braun.